

Patogeneza przewlekłej białaczki szpikowej — od genu do terapii celowanej

Pathogenesis of chronic myeloid leukemia — from gene to targeted therapy

Joanna Żołnierowicz, Jerzy Kawiak, Grażyna Hoser

Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Rozwój przewlekłej białaczki szpikowej (CML) jest związany z pojawieniem się wzajemnej translokacji chromosomalnej (9;22)(q34;q11). W wyniku wymiany fragmentów chromosomów 9 i 22 powstaje skrócony chromosom 22 — chromosom Philadelphia (Ph), który niesie nowy gen, kodujący konstytutywnie aktywną fuzyjną kinazę BCR-ABL1. Związana z tym zmieniona aktywność kinazy ABL1 prowadzi do zwiększonej proliferacji, oporności na apoptozę i zaburzonej adhezji komórek. Przełom w leczeniu CML nastąpił wraz z odkryciem specyficznego inhibitora kinazy tyrozynowej, w tym ABL1 i BCR-ABL1 — imatynibu. Imatinib hamuje aktywność kinazową BCR-ABL1, przylączając się do miejsca aktywnego kinazy ABL1 w konformacji nieaktywnej i tym samym uniemożliwiając przylączenie cząsteczki ATP, co jest niezbędne, by enzym był aktywny. Jakkolwiek terapia CML z użyciem imatynibu jest wysoce efektywna, pojawienie się u wielu pacjentów oporności na ten inhibitor prowadzi do progresji choroby. W przypadku stwierdzenia oporności na imatinib pomoc w pokonaniu oporności i uzyskaniu poprawy terapeutycznej mogą przynieść zwiększenie dawki imatynibu, zmiana leczenia na inhibitory kinazy tyrozynowej II generacji lub allogeniczne przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, kinaza BCR-ABL1, terapia celowana, imatinib, oporność na leczenie

Hematologia 2010; 1, 3: 195–218

Abstract

The occurrence of chronic myeloid leukemia (CML) is related to the appearance of reciprocal chromosomal translocation (9;22)(q34;q11). As a result of translocation between chromosomes 9 and 22, shortened chromosome 22 — Philadelphia (Ph) chromosome arises, coding for constitutively active protein tyrosine kinase, BCR-ABL1. The subsequent deregulation of the ABL1 kinase activity in cells leads to enhanced proliferation, resistance to apoptosis and altered adhesion. The discovery of imatinib, a relatively specific tyrosine kinase inhibitor, including ABL1 and BCR-ABL1 kinases, was a breakthrough in CML treatment. Imatinib functions by binding to the active site of ABL1 kinase in an inactive conformation, thus blocking the ATP binding site crucial for enzyme activity. Although imatinib has revolutionized

Adres do korespondencji: Grażyna Hoser, Zakład Cytologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99/103, 01–813 Warszawa, tel.: 22 569 38 30, faks: 22 569 37 12, e-mail: graho@cmkp.edu.pl

CML therapy, appearance of resistance to this inhibitor leads to CML progression. In case of imatinib-resistance, several possible strategies exist for the management of the disease, which include increasing the dose of imatinib, changing therapy to the 2nd generation tyrosine kinase inhibitors or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Key words: chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 kinase, targeted therapy, imatinib, drug resistance

Hematologia 2010; 1, 3: 195–218

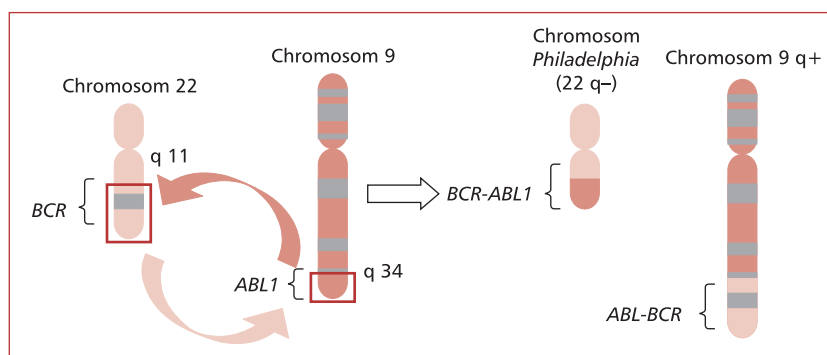
Wprowadzenie

Przewlekła białaczka szpikowa (CML, *chronic myeloid leukaemia*) to nowotwór mieloproliferacyjny, którego istotą jest klonalny rozrost wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego. Jest to pierwsza choroba nowotworowa, której rozwój powiązano ze specyficzną zmianą cytogenetyczną — translokacją chromosomową, skutkującą powstaniem fuzyjnej onkogennej kinazy tyrozynowej.

Przewlekłą białczkę szpikową opisał po raz pierwszy w 1845 roku Huges Bennett, który przypuszczał, że obserwuje objawy infekcji. Pięć tygodni później białczkę tę opisał niezależnie Robert Virchow. Obaj obserwowali bezbarwne komórki z ziarnistymi, wielokształtnymi jądrami komórkowymi [1]. Dwa lata później Virchow zaproponował termin „białaczka”, a w 1870 roku Neumann stwierdził, że obserwowane w rozwoju tej choroby komórki pochodzą ze szpiku kostnego [1]. W 1960 roku pracujący w Filadelfii badacze, Peter Nowell i David Hungerford, zaobserwowali charakterystyczną dla komórek CML zmianę chromosomową — skróconą pochodną chromosomu 22, nazwaną chromosomem *Philadelphia* (Ph) [2]. Trzydzieści lat później Janet Rowley stwierdziła, że chromosom Ph po-

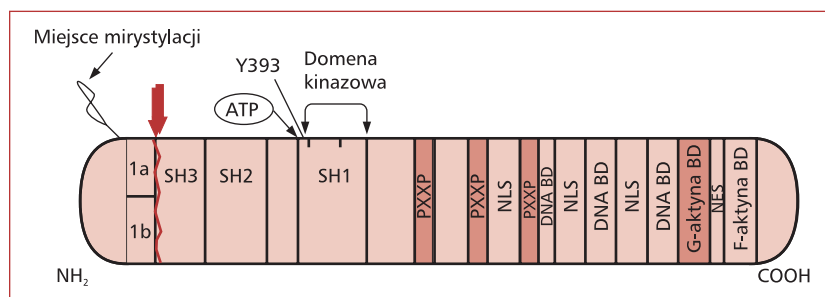
wstaje w wyniku wymiany fragmentów długich ramion między chromosomami 9 i 22 [3], prowadzącej do skrócenia chromosomu 22 i wydłużenia chromosomu 9 (ryc. 1). W latach 80. XX wieku dokładnie poznano rejony chromosomów, w obrębie których zachodzi translokacja [4, 5]. Stransfekowanie genem dla powstającej w wyniku translokacji kinazy BCR-ABL1 komórek mysiego szpiku kostnego, podanie ich ponownie zwierzętom i obserwacja rozwoju choroby o przebiegu podobnym do CML stanowiły dowód, że gen fuzyjny dla kinazy BCR-ABL1 na chromosomie Ph jest czynnikiem wywołującym CML, a nie tylko jej markerem [6, 7].

Pierwszą formalną klasyfikację nowotworów mieloidalnych opracował William Dameshek w 1951 roku [8]. Wprowadził on termin chorób mieloproliferacyjnych (MPD, *myeloproliferative disorders*) i do tej kategorii zaliczył między innymi CML, ze względu na jej cechy kliniczne i histologiczne [9]. Aktualną klasyfikację nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego opublikowała we wrześniu 2008 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [10]. Podstawą tej klasyfikacji są informacje o cechach morfologicznych, cytochemicznych, immunofenotypowych, genetycznych i klinicznych. Przewlekłą białczkę szpikową zali-



Rycina 1. Translokacja (9;22)(q34;q11). Chromosom *Philadelphia* (skrótowy chromosom 22) powstaje w wyniku przeniesienia fragmentu genu dla kinazy *ABL1* z chromosomu 9 w miejsce pęknięcia chromosomu 22 w obrębie genu *BCR*

Figure 1. Translocation (9;22)(q34;q11). Philadelphia chromosome (shortened chromosome 22) arises as a result of translocation of *ABL1* gene on chromosome 9 to *BCR* gene on chromosome 22



Rycina 2. Schemat budowy ludzkiego białka p145 ABL1 z zaznaczonymi domenami funkcyjnymi oraz miejscem pęknięcia genu oznaczonym strzałką, prowadzącym do powstania onkogennej kinazy BCR-ABL1. Zmodyfikowano według [14]

Figure 2. Schematic presentation of the protein domains located within human normal p145 ABL1 protein, the red arrowheads indicate the position of the breakpoints leading to aberrant oncogenic BCR-ABL1 kinase. Modified according to [14]

czono do kategorii nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN, *myeloproliferative neoplasms*) [10, 11].

Patogeneza

Rozwój CML wiąże się z translokacją chromosomową w pojedynczej pluripotencjalnej komórce macierzystej szpiku kostnego, prowadzącą do powstania onkogennej fuzyjnej kinazy tyrozynowej BCR-ABL1. Konstytutywnie aktywna kinaza nadaje tej komórce przewagę proliferacyjną nad prawidłowymi komórkami hematopoetycznymi, przyczyniając się do rozrostu nowotworu. Kinazy tyrozynowe to białka, które przez domenę katalityczną, zwaną miejscem wiążącym adenosynotrifosforan (ATP, *adenosine triphosphate*), przenoszą grupę fosforanową z cząsteczki ATP na tyrozynę w substracie, powodując jego fosforylację [12].

Gen *ABL1* i jego białkowy produkt

Gen *ABL1* (*Abelson leukemia*) jest ludzkim homologiem wirusowego onkogenu *abl* (v-abl) znalezionej w mysim wirusie białaczki Abelsona (A-MuLV, *Abelson–Murine leukemia virus*), kodującym niereceptorową kinazę tyrozynową z rodziny Src [13]. Wirusowa forma genu *ABL* wywodzi się z komórkowego *ABL1* (c-*ABL*). Przypuszcza się, że na pewnym etapie ewolucji wirus mysiej białaczki Abelsona włączył ludzki gen *ABL1* [14]. Ludzki gen kodujący kinazę ABL1 leży na dłuższym ramieniu chromosomu 9 (9q34.1) i składa się z 12 egzonów o długości 230 kb.

U ludzi (podobnie jak u myszy) występują dwa rodzaje kinaz z grupy Abl — kinaza c-ABL (ABL1) oraz kinaza ARG (*Abelson-related gene*), nazywana także ABL2. W wyniku alternatywnego cięcia i skła-

dania pierwszego egzonu genu *ABL1* powstają dwie izoformy białka ABL1 (1a i 1b u ludzi oraz I i IV u myszy), obie o masie molekularnej 145 kDa [15]. Obie izoformy różnią się jedynie niewielkim N-końcowym fragmentem — miejscem mirastylacji, które jest obecne na N-końcu ludzkiej izoformy 1b oraz mysiej IV (ryc. 2). Mirastylacja to nieodwracalna modyfikacja białka, zachodząca w trakcie i po translacji, ułatwiająca jego połączenie z błoną komórkową oraz innymi białkami [16]. Bierze także udział w regulacji aktywności katalitycznej kinazy [17].

Za miejscem mirastylacji na aminowym końcu kinazy znajdują się domeny SH1-3 (*Src-homology 1-3*). Domena SH1 jest domeną katalityczną (kinazową) regulującą aktywność kinazową białka. Katalizuje fosforylację reszt tyrozynowych w białkach będących substratami kinazy BCR-ABL1. W obrębie tej domeny znajduje się miejsce autofosforylacji kinazy ABL1. Domeny SH2 i SH3 są związane z oddziaływaniem kinazy z białkami substratowymi. Domena SH2 rozpoznaje i wiąże się z ufosforylowanymi sekwencjami zawierającymi tyrozynę, odgrywając kluczową rolę w szlaku przekazywania sygnału. Domena SH3 rozpoznaje i wiąże sekwencje białkowe bogate w prolinę [18], a także reguluje aktywność kinazową domeny SH1 [13]. W centralnej części kinazy znajdują się sekwencje bogate w prolinę (PxxP), rozpoznawane i wiązane przez domeny SH3 innych białek. Aminowa część kinazy ABL1 jest konserwowana ewolucyjnie w przeciwieństwie do większości domen karboksylowej części białka [15].

Wśród domen C-końca znajdują się domeny sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS, *nuclear localization sequences*) oraz sekwencja eksportu jądrowego (NES, *nuclear export signal*). Domeny te umożliwiają przemieszczanie się kinazy ABL1 między cy-

toplazmą a jądrem komórkowym w odpowiedzi na różnorodne sygnały komórkowe [19]. W obrębie C-końca kinazy ABL1 znajduje się także domena wiążąca DNA (DNA BD, *DNA binding domain*), która rozpoznaje specyficzne sekwencje DNA, w szczególności w obrębie uszkodzonej struktury DNA. Zdolność do wiązania kwasu dezoksyrybonukleinowego przez kinazę ABL1 jest tracona podczas mitozy, gdy kinazy cyklu komórkowego fosforylują c-końcową sekwencję kinazy ABL1 [20, 21].

Kinazę ABL1 cechuje zdolność do wiązania filamentów aktyny. Karboksylowa część białka zawiera domeny wiążące F-aktynę (*F-actin BD*), a także domeny wiążące jej monomeryczną formę — G-aktynę (*G-actin BD*) [22]. Kinaza ABL1 prawdopodobnie modyfikuje bezpośrednio poprzez te domeny strukturę cytoszkieletu aktynowego. Jednocześnie związanie aktyny może ułatwiać kinazie ABL1 kontakt z innymi białkami wiążącymi się z cytoszkieletem, które mogą wpływać na jego dynamikę zależnie od fosforylacji ABL1 [15].

Kinaza ABL1 jest zlokalizowana w wielu przedziałach subkomórkowych, głównie w cytoplazmie i jądrze komórkowym, a także w mitochondriach oraz retikulum endoplazmatycznym [23], cytoszkielecie aktynowym [24] i w tratwach lipidowych błony komórkowej [25]. Endogenna kinaza ABL1 w komórkach hematopoetycznych gromadzi się głównie w cytoplazmie, natomiast nadekspresja egzogennej kinazy powoduje kumulację białka głównie w jądrze komórkowym [26].

Funkcje kinazy ABL1 w komórce są ściśle regulowane przez różnorodne oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe utrzymujące białko w konformacji zamkniętej (nieaktywnej). Autoinhibicja zachodzi między innymi wskutek interakcji między domeną SH3 a rejonem bogatym w prolinę w miejscu połączenia domen SH2 i katalitycznej (SH1) oraz samą domeną katalityczną [27], między domeną SH3 a domeną SH1, a także oddziaływania reszty mirystylowej z hydrofobową kieszenią w karboksylowym końcu kinazy [17, 28]. Zidentyfikowano także białka, takie jak Abi-1, Abi-2 (*Abl interactor proteins 1 and 2*) oraz PAG/Msp23, które, wiążąc się z domeną SH3, aktywują jej funkcje inhibitorowe [29–31]. Aktywność kinazy ABL1 również jest regulowana przez fosforylację. Kluczowa w utrzymaniu konformacji otwartej (aktywnej) jest fosforylacja Tyr245, leżącej między domenami SH2 i katalityczną, oraz Tyr412 w pętli aktywacyjnej w domenie katalitycznej [32].

Znaczna część kinazy ABL1 zgromadzonej w cytoplazmie jest związana przez domeny wiążące aktynę na karboksylowym końcu białka z fila-

mentami cytoszkieletu aktynowego [33]. Połączenie to utrzymuje kinazę w konformacji nieaktywnej [34]. Aktywność cytoplazmatyczna kinazy ABL1 jest przejściowo przywracana w następstwie związanej z receptorami integrynowymi adhezji komórki do podłoża [21]. Wtedy też następuje przemieszczenie się ABL1 z jądra komórkowego do cytoplazmy i lokalizacja kinazy w płytce przylegania [21]. Katalityczna aktywność kinazy ABL1 wpływa lokalnie na organizację cytoszkieletu aktynowego, powodując między innymi powstawanie wypustek cytoplazmatycznych i migrację komórek [35]. Cytoplazmatyczna kinaza ABL1 jest także aktywowana w odpowiedzi na czynniki wzrostu, takie jak płytkopochodny czynnik wzrostu β (PDGF β , *platelet-derived growth factor* β) oraz naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) [36]. Obserwowany wzrost aktywności kinazy ABL1 wiąże się ze zwiększoną aktywnością kinazy Src [36, 37], która uczestniczy w indukcji sygnału promitotycznego zainicjowanego przez receptory dla czynników wzrostu [38]. Cytoplazmatyczny ABL1 może więc, obok wpływu na dynamikę cytoszkieletu aktynowego, odgrywać także rolę w promowaniu syntezy DNA podczas mitogenezy.

Aktywność jądrowej kinazy ABL1, w przeciwieństwie do białka zgromadzonego w cytoplazmie, zmienia się zależnie od faz cyklu komórkowego i jest zwiększona w fazie S [15]. W fazie G1 cyklu komórkowego kinaza ABL1 jest związana z białkiem Rb, będącym produktem genu supresorowego *RBI*. Pętla wiążąca ATP w domenie kinazowej ABL1 jest wiązana przez kieszeń łańcuchów polipeptydowych na karboksylowym końcu białka Rb, powodując zahamowanie aktywności kinazowej ABL1 [39]. Po przejściu punktu kontrolnego G1 białko Rb jest fosforylowane przez kompleksy cykliny D z CDK4/6, co skutkuje utratą jego aktywności oraz uwolnieniem kinazy ABL1 i jej aktywacją. Aktywna kinaza ABL1 może uczestniczyć w fosforylacji C-końcowej domeny (CTD, *C-terminal domain*) polimerazy II RNA, stymulując transkrypcję genów fazy S [39]. Sugerowano, że przez interakcje z białkiem Rb kinaza ABL1 odgrywa rolę w progresji cyklu komórkowego [40].

Kinaza ABL1 krąży w komórce między cytoplazmą a jądrem komórkowym, dzięki sygnałom z trzech domen sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS, *nuclear localization sequences*) oraz domenie NES. Utrzymanie wysokiego stężenia kinazy ABL1 w cytoplazmie jest związane z tworzeniem kompleksu z białkiem 14-3-3. Białko to wiąże się do ufosforylowanej tyrozyny w pozycji 735 (Tyr735) położonej między drugą a trzecią domeną NLS kinazy ABL1 [41]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA spowodowane

przez czynniki genotoksyczne kinaza ABL1 — niezależnie od tego, czy jest aktywna, czy nie — jest transportowana z cytoplazmy do jądra komórkowego [42]. Białko 14-3-3 jest fosforylowane przez kinazę JNK (c-Jun, *c-Jun N-terminal kinase*) [43], co powoduje jego odłączenie się od kinazy ABL1 i przejściową translokację do jądra komórkowego [44]. Kinaza JNK należy do kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*), czyli substancjami aktywującymi podziały mitotyczne. Stanowi ona grupę kinaz MAP określaną jako kinazy aktywowane stresem (SAPK, *stress-activated protein kinases*). Kinaza JNK jest aktywowana w odpowiedzi na cytokiny i czynniki środowiskowe indukujące stres komórkowy [45]. Innym proponowanym mechanizmem uwalniania kinazy ABL1 z kompleksu z białkiem 14-3-3 jest jego pocięcie przez kaspazy, pojawiające się wskutek działania czynników indukujących apoptozę [44], podobnie jak w przypadku uwalniania z kompleksu z białkiem 14-3-3 proapoptotycznych białek Bad [46] i Bax [47]. Kinaza ABL1, zlokalizowana w jądrze komórkowym, wskutek działania czynników genotoksycznych, takich jak promieniowanie jonizujące, cisplatyna czy mitomycyna C, jest następnie przez nie aktywowana [15]. W odpowiedzi na promieniowanie jonizujące seryna w pozycji 465 (Ser465) w domenie kinazowej ABL1 jest fosforylowana przez kinazę ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*). U chorych na ataksję—teleangiektazję (AT, *ataxia-telangiectasia*) kinaza ATM jest kodowana przez zmutowany gen. Fosforylacja kinazy ATM przez katalityczną podjednostkę kinazy DNA-PK (*DNA-dependend protein kinase*) może być bezpośrednia lub pośrednia [39, 48]. Aktywny ABL1, przez zwiększenie transkrypcyjnej aktywności p53 i jego homologu p73, uczestniczy w apoptozie indukowanej czynnikami genotoksycznymi [49]. Białko Mdm2, wiążąc się z p53, hamuje jego aktywność oraz prowadzi do jego degradacji, kierując je na drogę ubiquitynacji [50, 51]. Kinaza ABL1, przez fosforylację tyrozyny 394 białka Mdm2, prowadzi do uwolnienia p53 z kompleksu, co pozwala na jego działanie jako czynnika transkrypcyjnego [52]. Promieniowanie jonizujące indukuje także zależną od kinazy ABL1 fosforylację białka Rad51, odgrywającego kluczową rolę w homologicznej naprawie podwójnych pęknięć nici DNA, hamując tym samym jego funkcje naprawcze [53]. Aktywowany przez czynniki genotoksyczne jądrowy ABL1 fosforyluje także p85 — podjednostkę kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*), przez co hamuje jej aktywność w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, działając proapoptotycznie [54]. Jednak w proapoptotycznej

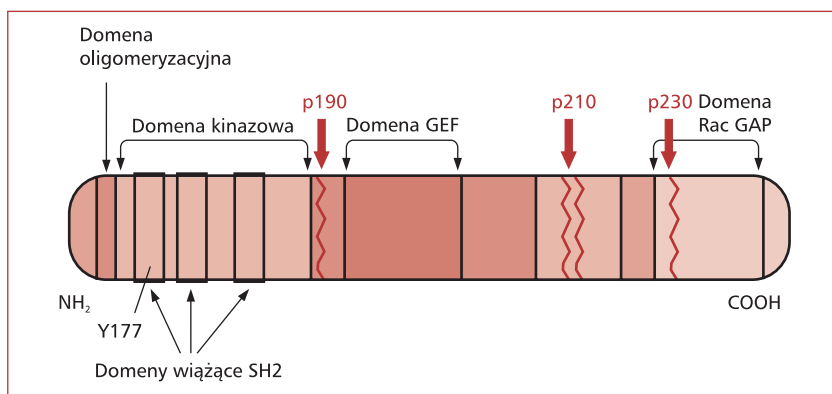
odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny uczestniczy cytoplazmatyczny ABL1. Wskutek działania nadtlenu wodoru (H₂O₂) następuje uwolnienie cytochromu C z mitochondriów, w co jest zaangażowana cytoplazmatyczna kinaza ABL1 [55].

Gen *BCR* i jego białkowy produkt

Ludzki gen *BCR* (*breakpoint cluster region*) znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 22 (22q11.2) i składa się z 23 egzonów o długości 130 kb [56]. Występuje powszechnie we wszystkich typach komórek. W ludzkich komórkach obserwowano porównywalny poziom transkryptu tego genu zarówno w liniach hematopoetycznych, jak i niehematopoetycznych [57]. U młodych kur najwyższą ekspresję mRNA obserwowano w komórkach mózgu [57]. Opisano kilka spokrewnionych z *BCR* pseudogenów znajdujących się na chromosomie 22, które nie podlegają jednak procesowi translacji (*BCR2*, *BCR3*, *BCR4*) [58], a także gen na chromosomie 17, który koduje funkcjonalne białko *ABR* (*active BCR-related gene*) [59].

Gen *BCR* koduje dwa transkrypty o długości 7,0 kb i 4,5 kb, z których powstają białka o wielkości odpowiednio 160 kDa i 130 kDa [60]. Białko BCR jest serynowo-treoninową kinazą, której ekspresja, podobnie jak białka ABL1, w komórkach hematopoetycznych linii granulocytarnej zachodzi głównie na wczesnych etapach różnicowania komórek (mieloblasty, promielocyty) i zmniejsza się znacząco wraz z różnicowaniem komórek [26]. Białko BCR bierze udział w przekazywaniu sygnału w komórkach — zarówno przez fosforylację, jak i wiązanie guanozynotrifosforanu (GTP, *guanosine triphosphate*). Pośredniczy także w procesach reperowania uszkodzeń DNA [14].

Pierwszy egzon białka BCR, składający się z trzech domen funkcyjnych, jako jedyny wchodzi w skład wszystkich znanych białek fuzyjnych BCR-ABL1. W obrębie pierwszego egzonu znajduje się domena kinazowa o aktywności kinazy serynowo-treoninowej (ryc. 3). Powoduje ona autofosforylację reszt serynowych i treoninowych białka BCR, a także fosforylację innych białek [61]. Domeny wiążące SH2 (*Src-homology 2-binding domain*), znajdujące się w pierwszym egzonie białka BCR, wiążą się z domenami SH2 innych białek przez ufosforylowane sekwencje zawierające serynę, treoninę lub tyrozinę [56]. Poprzez ufosforylowaną tyrozinę (Y177) w pierwszej domenie wiążącej SH2 do kinazy BCR wiąże się białko Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) [56]. Białko adaptorowe Grb2 pośredniczy w przekazywaniu sygnału od receptora EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Przyczynia się w tym szlaku do aktywacji białka Ras,



Rycina 3. Schemat budowy ludzkiego białka p160 BCR z zaznaczonymi domenami funkcyjnymi oraz miejscami pęknięcia genu (pogrubione strzałki), prowadzącymi do powstania różnych form onkogennej kinazy BCR-ABL1. Zmodyfikowano według [14]

Figure 3. Schematic presentation of the protein domains located within human normal p160 BCR protein, the colour arrowheads indicate the position of the breakpoint leading to various aberrant oncogenic BCR-ABL1 kinases. Modified according to [14]

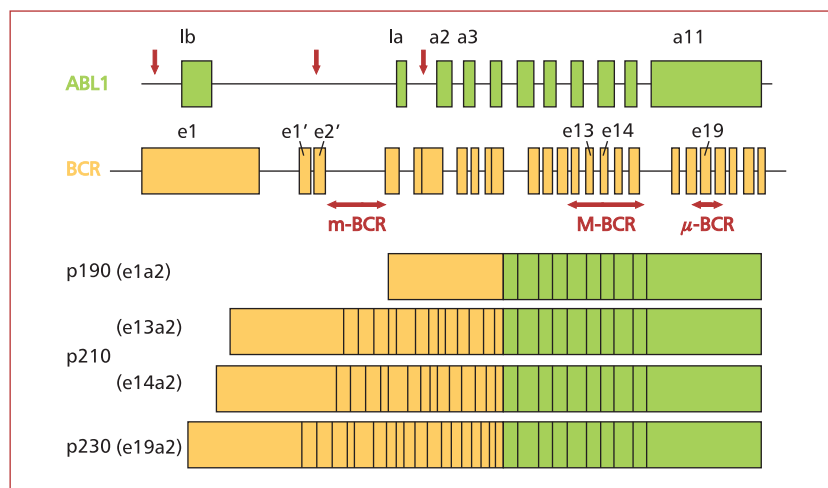
pośredniczącego w indukcji ekspresji genów związanych z procesem proliferacji, różnicowania i przeżycia komórek [62]. Substratem kinazy BCR jest również białko Bap-1 (*BRCA1-associated protein 1*), łączące się z nią przez kolejną domenę wiążącą SH2. Białko Bap-1 wiąże się z domeną RING białka BRCA1 biorącego udział w procesach naprawy DNA [63]. Do białka BCR, przez ufosforylowane seryny i treoniny, wiąże się także domena SH2 kinazy ABL1 [64]. Trzecią domeną funkcyjną pierwszego egzonu BCR jest domena oligomeryzacyjna, znajdująca się na aminowym końcu kinazy [56]. Poprzez tę domenę białka BCR i BCR-ABL1 mogą się wiązać ze sobą, a także tworzyć heterodimery [65]. Zarówno domena oligomeryzacyjna (tzw. domena *coiled-coil*), jak i tyrozyna 177 odgrywają kluczową rolę w transformacji nowotworowej komórek związanej z ekspresją kinazy BCR-ABL1 [66].

Środkowy region białka BCR oraz jego karboksylowy koniec oddziałują z białkami G (białka wiążące GTP), odgrywającymi ważną rolę w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału, związanym ze wzrostem, różnicowaniem, proliferacją, migracją, przeżyciem i śmiercią komórek [67]. Centralny region białka BCR wykazuje homologię do białek z rodziny aktywatorów wymiany nukleotydów guaninowych (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) [68, 69]. Aktywują one białko G, katalizując wymianę związanego z nim guanozynodifosforanu (GDP, *guanosine diphosphate*) na GTP. Domena GEF białka BCR wykazuje szczególną homologię do białkowego produktu drożdżowego genu *cdc24* oraz jego ludzkiego odpowiednika — produktu on-

kogenu *DBL* [68]. Białka te pełnią rolę czynnika wymiany nukleotydów guaninowych dla małych GTPaz z rodziny Ras, które głównie poprzez kaskadę MAPK prowadzą do aktywacji czynników transkrypcyjnych, związanych z proliferacją, różnicowaniem i przeżyciem komórki [62, 70]. Domena GEF białka BCR wiąże się także z biorącym udział w naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie białkiem XPB (*Xeroderma Pigmentosum B*) [71].

Karboksylowy koniec białka BCR wykazuje natomiast homologię do białek GAP (*GTPase activating protein*), odpowiedzialnych za inaktywację białek G przez hydrolizę GTP do GDP. C-końcowa domena białka BCR jest pod względem strukturalnym podobna do białka GAP specyficznego dla GTPaz z rodziny Rho, takich jak RhoA, Rac1 i Cdc42 [72], związanych z reorganizacją cytoszkieletu w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe [73].

Białko BCR można lokalizować zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. W komórkach w fazie G₀/G₁ białko BCR znajduje się głównie w cytoplazmie, natomiast w komórkach będących w metafazie podziału mitotycznego jego lokalizacja jest związana z chromosomami [74]. W jądrze komórkowym BCR wiąże się także ze skondensowaną chromatyną (heterochromatyną) w interfazie [74]. Wykazano, że na obszarze cytoplazmy gromadzą się oba powstające białka BCR, natomiast w jądrze komórkowym znajduje się głównie białko o masie 130 kDa, co sugeruje, że obie kinazy mogą pełnić różne funkcje w komórce [75].



Rycina 4. Struktura genomowa *ABL1* i *BCR* oraz mRNA białek fuzyjnych BCR-ABL1. Strzałkami zaznaczono miejsca pęknięcia w obrębie genu *ABL1* i obszary pęknięć genu *BCR*

Figure 4. Genomic structure of *ABL1* and *BCR* and mRNA of BCR-ABL1 fusion proteins. Arrows indicate breakpoints in *ABL1* and *BCR* genes

Gen *BCR-ABL1* i jego białkowy produkt

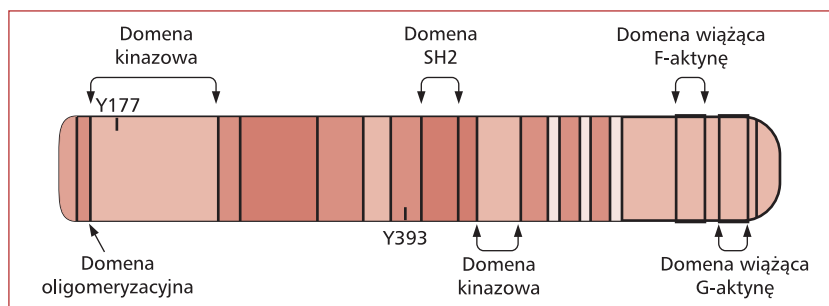
W wyniku translokacji (9;22)(q34;q11) powstają dwa fuzyjne geny — *BCR-ABL1* na chromosomie 22 i *ABL-BCR* na chromosomie 9 (ryc. 1). Mimo że mRNA genu *ABL-BCR* jest znajdowane u około 70% chorych na CML [76], nie wykazano dotychczas istnienia białka ABL-BCR. Patogeneza CML wiąże się z fuzyjnym białkiem BCR-ABL1 powstającym na matrycy fuzyjnego genu *BCR-ABL1*. Zależnie od miejsca pęknięcia chromosomów mogą powstać różne rodzaje białka BCR-ABL1 różniące się masą i właściwościami biologicznymi, w tym p190^{BCR/ABL}, p210^{BCR/ABL}, p230^{BCR/ABL} (ryc. 4).

Zgodnie z klasyfikacją WHO z 2008 roku chromosom Ph znajduje się w komórkach białaczkowych u wszystkich chorych na CML [9, 10]. W komórkach tych osób w ponad 99% przypadków występuje białko BCR-ABL1 o masie 210 kDa. Występuje ono także u 50–80% dorosłych i u 10% dzieci chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) z wykrywalnym chromosomem Ph. Chromosom ten występuje u około 20% wszystkich chorych na ALL. Wśród 2% pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML, *acute myeloid leukemia*), u których wykrywalny jest chromosom Ph, u połowy znajduje się także białko BCR-ABL1 o masie p210 kDa [14]. Kinaza BCR-ABL1 o masie 190 kDa występuje u 20–50% dorosłych i 90% dzieci chorych na ALL, u 50% chorych na AML oraz sporadycznie u chorych na CML, u których wykrywalny jest chromosom Ph [14]. Największe spośród trzech form kinazy BCR-ABL1 — białko o masie 230 kDa —

występuje niekiedy u chorych na atypową (neutrofilową) przewlekłą białaczkę szpikową (aCML, *atypical chronic myeloid leukemia*) [77].

Pęknięcia DNA występują w obrębie intronów, czyli fragmentów sekwencji genu, które nie kodują sekwencji białkowej, a jedynie rozdzielają kodujące egzony. Pęknięcia w obrębie genu *ABL1* występują na dużym obszarze, ponad 300 tysięcy par zasad, w obrębie końca 5' względem pierwszego alternatywnego egzonu 1b, w kierunku 3' względem alternatywnego egzonu 1a lub między tymi egzonami [13, 78]. Niezależnie jednak od dokładnego miejsca pęknięcia genu *ABL1* składanie fuzyjnego transkryptu prowadzi do powstania cząsteczki mRNA, w której sekwencja *BCR* jest połączona z drugim egzonem (a2) *ABL1*. Fuzyjne białka BCR-ABL1 charakteryzują się więc takim samym fragmentem pochodzącym z genu *ABL1*. Różnice w ich wielkości wynikają z różnych miejsc pęknięcia w genie *BCR*.

Pęknięcia w genie *BCR* lokalizują się w obrębie jednego z trzech regionów częstych złamań [13, 78] (ryc. 4). Najczęściej złamania genu zachodzą na obszarze 5,8 tysiąca par zasad, w regionie nazwanym M-BCR (*major-BCR*), zawierającym pięć egzonów nazwanych b1-b5, leżących między 12. a 16. egzonem genu *BCR*. W wyniku alternatywnego składania mRNA powstają dwa transkrypty z połączeń *BCR-ABL1* — b2a2 (e13a2) oraz b3a2 (e14a2). Translacja obu cząsteczek mRNA prowadzi do powstania kinazy p210^{BCR/ABL} — białka



Rycina 5. Schemat budowy fuzyjnej kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 p210

Figure 5. Schematic presentation of the fusion tyrosine kinase BCR-ABL1 p210

o masie 210 kDa. Nie znaleziono korelacji między wystąpieniem kinazy p210^{BCR/ABL} z transkryptu b2a2 lub b3a2 a czasem trwania fazy przewlekłej CML oraz czasem przeżycia chorych, a także odpowiedzi na leczenie interferonem α (IFN α) [79]. Drugi region złamań, nazwany m-BCR (*minor-BCR*), leży na obszarze 54,4 tysiąca par zasad, między alternatywnym egzonem e2' a egzonem e2. Powstający hybrydowy transkrypt e1a2 ulega translacji na białko o masie 190 kDa — kinazę p190^{BCR/ABL}. Trzeci region złamań, nazwany μ -BCR (*micro-BCR*), leży między egzonami 19. a 20. genu BCR, nazwanymi c3 i c4. Fuzyjny transkrypt e19a2 (c3a2) koduje kinazę p230^{BCR/ABL} — białko o masie 230 kDa (ryc. 4).

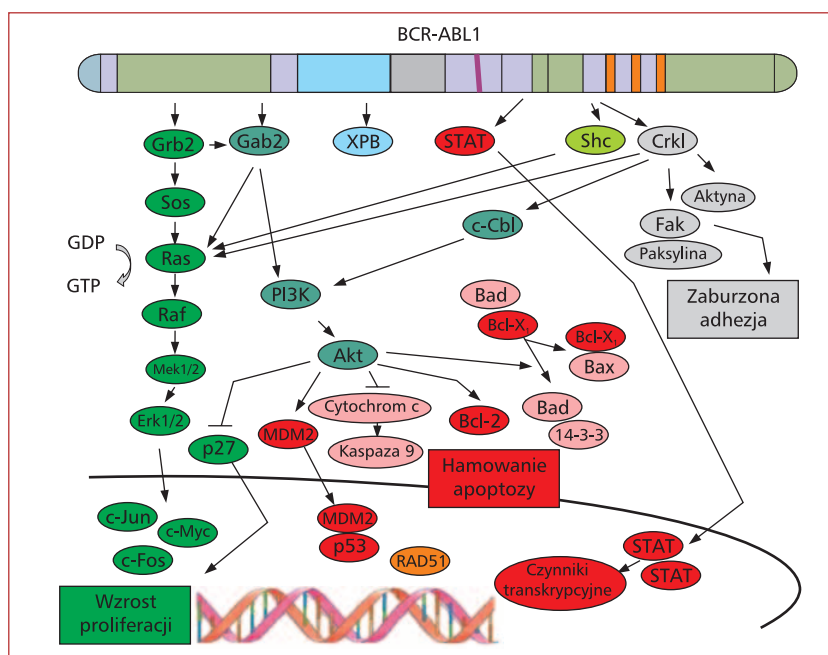
W komórkach niepoddawanych działaniu czynników farmakologicznych fuzyjna kinaza BCR-ABL1 p210 lokalizuje się wyłącznie na obszarze cytoplazmy [80] i wykazuje niepodlegającą prawidłowej regulacji, konstytutywną aktywność kinazy tyrozynowej. Prowadzi to do transformacji nowotworowej prawidłowych komórek, w których wystąpiła translokacja (9:22) [81]. Kluczowymi w transformacji nowotworowej domenami kinazy BCR-ABL1 są pochodzące od kinazy ABL1: domena katalityczna o aktywności kinazy tyrozynowej SH1 [82], domeny wiążące aktynę [83], a w przypadku niektórych komórek, na przykład fibroblastów, domena SH2 wiążąca się z ufosforylowanymi sekwencjami białek [84, 85]. Pozostałe kluczowe dla procesu transformacji domeny pochodzące od kinazy BCR to domena oligomeryzacyjna, odpowiedzialna za powstawanie homotetramerów [65], i tyrozyna w pozycji 177 zawarta w domenie katalitycznej o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, wiążąca białko adaptorowe Grb2 [86] (ryc. 5).

Białko BCR działa jako negatywny regulator aktywności kinazy BCR-ABL1 zarówno przez tworzenie heterodimerów, jak i oddziaływanie z domeną

SH2 fuzyjnej kinazy [87]. Domena SH2 fuzyjnego białka BCR-ABL1, wiążąc się do jednej z ufosforylowanych seryn (S354) białka BCR, powoduje hamowanie onkogennego działania fuzyjnej kinazy [88]. Jednak mutacja punktowa tej seryny (S254A) powoduje nie tylko zatrzymanie hamującego wpływu białka BCR, lecz również wzrost onkogennej aktywności kinazy BCR-ABL1 [89]. Brak N-końcowego fragmentu kinazy ABL1 skutkuje konstytutywną aktywnością fuzyjnego białka. Konstytutywna aktywność kinazowa białka p210^{BCR/ABL} prowadzi do fosforylacji wielu białek komórkowych oraz autofosforylacji kinazy BCR-ABL1, co z kolei powoduje wiązanie do niej samej licznych białek, w tym cząsteczek adaptorowych. Aktywacja różnorodnych szlaków sygnałowych, takich jak Ras/MAPK, PI3K czy STAT5 przez kinazę BCR-ABL1, prowadzi do transformacji nowotworowej w związku z zaburzeniem podstawowych procesów w komórce, związanych z kontrolą proliferacji, różnicowania i przeżycia [90] (ryc. 6). Komórki BCR-ABL1-dodatnie niezależnią się od obecności czynników wzrostowych w środowisku. Charakteryzują się zwiększoną proliferacją, opornością na apoptozę i niestabilnością genetyczną prowadzącą do progresji CML, a także zaburzoną adhezją komórek skutkującą ich rozprzestrzenianiem się i nieprawidłowym uwalnianiem do krwi obwodowej komórek nie-dojrzałych [91].

Indukcja proliferacji i przeżywanie komórek BCR-ABL1-pozytywnych

Aktywacja czynników transkrypcyjnych w jądrze komórkowym zachodzi głównie poprzez szlak sygnałowy Ras/MAPK. W prawidłowych komórkach, będących pod kontrolą czynników zewnątrzkomórkowych, wiążących się z receptorowymi kinazami tyrozynowymi znajdującymi się w błonie komórkowej, tym szlakiem są przekazywane sygna-



Rycina 6. Drogi przekazywania sygnału, na które wpływa kinaza BCR-ABL1

Figure 6. Signal transduction pathways affected by BCR-ABL1 kinase

ły promujące proliferację, różnicowanie i przeżycie komórki [92, 93]. Transformacja nowotworowa, do której dochodzi za pośrednictwem kinazy BCR-ABL1, wiąże się między innymi z konstytutywną aktywacją szlaku sygnałowego Ras/MAPK [94, 95]. Autofosforylacja tyrozyny w pozycji 177 (Y177) w kinazie BCR-ABL1 prowadzi do związania białka adaptorowego Grb2 [96], a następnie połączenia z białkiem SOS. Białko to stymuluje wymianę GDP na GTP w białku Ras i stabilizuje je w aktywnej formie [97]. Białko Ras należy do rodziny małych białek o aktywności GTP--azy, wykazujących zdolność wiązania GTP. Dwie inne cząsteczki adaptorowe, Shc i Crkl, także mogą pośredniczyć w aktywacji białka Ras [13]. Obie cząsteczki są substratami BCR-ABL1, wiążąc się z fragmentem białka fuzyjnego pochodzącym od kinazy ABL1 przez swoje domeny SH2 (Shc) lub SH3 (Crkl) [98, 99]. Białko Ras aktywuje serynowo-treoninową kinazę Raf, która inicjuje kaskadę sygnałów poprzez serynowo-treoninowe kinazy Mek1/Mek2 (*mitogen extracellular kinase 1/2*) i Erk1/Erk2 (*extracellularly regulated protein kinases 1/2*), należące do kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) [97]. Kinazy przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do fosforylacji i aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak c-Jun, c-Myc i c-Fos, co w konsekwencji prowadzi do ekspresji genów związanych z procesem proliferacji [100].

Indukcja proliferacji w komórkach z ekspresją kinazy BCR-ABL1 zachodzi także przez hamowanie aktywności białka p27 [101], które jest kluczowym inhibitorem przejścia z fazy G₁ do fazy S cyklu komórkowego. Inhibitor p27 jest kierowany na drogę degradacji proteosomalnej przez szlak sygnałowy PI3K/Akt [102].

Kinaza fosfatydylo-3-inozytoli katalizuje fosforylację fosfolipidów inozytoli do cząsteczki fosfatydyloinozytoli-3-fosforanu (PIP₃, *phosphatidylinositol (3)-trisphosphate*), który bierze udział w aktywacji wielu procesów komórkowych, takich jak wzrost, proliferacja, różnicowanie, przeżycie, migracja i transport wewnątrzkomórkowy [103, 104]. Aktywna PI3K jest niezbędna do proliferacji komórek z ekspresją fuzyjnej kinazy BCR-ABL1 [105]. Związane z kinazą BCR-ABL1 przez ufosforylowaną tyrozynę 177 w części pochodzącej od kinazy BCR białko Grb2 stanowi rusztowanie dla białka Gab2, które jest następnie fosforylowane przez fuzyjną kinazę [106]. Fosforylacja białka Gab2 prowadzi do aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/Akt, ale także Ras/MAPK [107]. Aktywacja szlaku PI3K/Akt przez kinazę BCR-ABL może się także odbywać przez związanie białka adaptorowego Crkl, a następnie c-Cbl do fuzyjnej kinazy w części pochodzącej od kinazy ABL1 [108]. Fosforylacja białka c-Cbl prowadzi do aktywacji kinazy PI3K, która aktywuje serynowo-treoninową kinazę Akt [105] w wyniku przy-

łączenia cząsteczki PIP3. Kinaza Akt jest także aktywowana przez interleukinę 3 (IL-3, *interleukin 3*) w szlaku kinazy PI3K [109]. Aktywna kinaza Akt promuje przeżycie komórki, fosforylując proapoptotyczne białko Bad, które, utrzymywane dzięki temu w kompleksie z białkiem 14-3-3, nie może oddziaływać z białkami Bcl-2 i Bcl-xL. To umożliwia wolnemu białku Bcl-xL związać się z białkiem Bax, nie dopuszczając w ten sposób do powstania proapoptotycznych homodimerów Bax [110].

Antyapoptotyczna aktywność kinazy Akt wiąże się także z hamowaniem aktywacji kaspazy 9 przez cytochrom C [111]. Wykazano, że właśnie aktywność kinazy BCR-ABL1 prowadzi do zahamowania kaspazy 9 [112]. Kinaza Akt bierze także udział w regulacji cyklu komórkowego i przeżycia komórek. Fosforyluje białko MDM2, które w tej formie przemieszcza się do jądra komórkowego, następnie wiąże się z białkiem p53 i w konsekwencji doprowadza do inaktywacji białka p53 [113]. Zarówno kinaza BCR-ABL1, jak i IL-3 powodują wzrost stężenia białka MDM2 w komórce, wpływając w ten sposób na wydłużenie przeżycia komórek [114]. Kinaza BCR-ABL1 poprzez kinazę PI3K powoduje także wzrost ekspresji hamującego apoptozę białka Bcl-2 [105]. Wzrost stężenia wolnych rodników tlenowych (ROS, *reactive oxygen species*) uszkadzających DNA również wiąże się z aktywacją PI3K poprzez fosforylację tyrozyny 177 w BCR-ABL1 [115]. Wolne rodniki tlenowe to jedna z przyczyn niestabilności genomu w komórkach z ekspresją kinazy BCR-ABL1.

Kinaza BCR-ABL1 powoduje fosforylację białek z rodziny przekaźników sygnałów i aktywatorów transkrypcji (STAT, *signal transducers and activators of transcription*), głównie STAT5 oraz w mniejszym stopniu STAT1 i 3 [116, 117]. Aktywacja białek STAT5 odgrywa rolę w dalszej transformacji nowotworowej komórek z ekspresją kinazy BCR-ABL1 [118]. Białka STAT są prawdopodobnie aktywowane przez kinazę BCR-ABL1 bezpośrednio — bez udziału kinaz tyrozynowych JAK (kinaz Janus), które odpowiadają za fosforylację STAT w niezmiennych nowotworowo komórkach [119]. Fosforylacja białek STAT zachodzi z udziałem domen SH2 i SH3 kinazy BCR-ABL1 [120]. Fosforylacja reszty tyrozynowej białek STAT powoduje ich dimeryzację i przemieszczenie się do jądra komórkowego, gdzie łączą się z DNA i aktywują transkrypcję genów docelowych [110]. Aktywacja białek STAT przez onkogeną kinazę BCR-ABL1 prowadzi głównie do zahamowania apoptozy, przez transkrypcyjną aktywację antyapoptotycznego białka Bcl-xL [121].

Wpływ białka BCR-ABL1 na adhezję komórek oraz na naprawę DNA

Hematopoeza jest regulowana między innymi przez procesy adhezji komórkowej. Przyleganie prawidłowych komórek krwiotwórczych do białek macierzy zewnątrzkomórkowej wiąże się z ich oddziaływaniem z fibronektyną poprzez integryny na powierzchni komórek. Komórki progenitorowe CML wykazują zmniejszoną adhezję do komórek zrębu oraz białek macierzy zewnątrzkomórkowej [122]. Może to zależeć od zaburzonej funkcji β -integryn na powierzchni komórek spowodowanej aktywnością kinazy BCR-ABL1 [123]. Substratami kinazowej aktywności BCR-ABL1 są także kinaza płytek przylegania Fak (*focal adhesion kinase*) [124] oraz paksylina — białko cytoszkieletu lokalizujące się w płytkach przylegania [125]. Ilość ufosforylowanej paksyliny i białka Fak jest zmniejszona w komórkach z ekspresją kinazy BCR-ABL1 [126]. Kinaza BCR-ABL1 fosforyluje adaptorowe białko Crkl [127], które wiąże się z białkami Fak i paksyliną, wpływając na proces adhezji i organizację cytoszkieletu.

Kinaza BCR-ABL1 bierze także udział w regulacji naprawy DNA po działaniu czynników uszkadzających DNA. Kinaza ta indukuje zwiększoną ekspresję białka Rad51, prowadząc do wzrostu oporności na leki cytostatyczne [128]. Aktywacja Rad51 prowadzi do stymulacji naprawy uszkodzonego DNA na drodze homologicznej rekombinacji [129]. Kinaza BCR-ABL1 prowadzi także do wydłużenia fazy G₂/M cyklu komórkowego, co również chroni komórki z jej ekspresją przed apoptozą spowodowaną czynnikami genotoksycznymi [130]. Przez domenę EGF białko BCR wiąże się z białkiem XPB [71]. Białko XPB wchodzi w skład kompleksu czynnika transkrypcyjnego IIH (TFIIH, *transcription factor II H*) — głównego składnika komórkowej odpowiedzi na uszkodzenia DNA, biorącego udział w transkrypcji, naprawie DNA, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie [131, 132]. Białko XPB wiąże się zarówno z białkiem BCR, jak i z fuzyjnym białkiem BCR-ABL1 o wielkości 210 kDa, konsekwencją czego jest fosforylacja XPB i jego niezdolność do udziału w procesie naprawy DNA. Może to być jedna z przyczyn transformacji CML do fazy kryzy blastycznej [133].

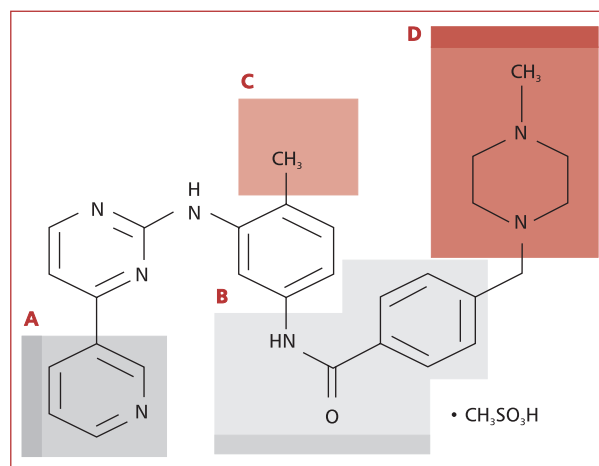
Komórki z ekspresją onkogennej kinazy BCR-ABL1 przeżywają nawet wtedy, gdy komórkowe mechanizmy naprawcze nie działają poprawnie. Niewydajna naprawa uszkodzeń materiału genetycznego prowadzi do zjawiska niestabilności genetycznej, objawiającego się nagromadzeniem aberracji chromosomowych w komórce. Jedną z przyczyn powsta-

nia niestabilności genetycznej jest wysokie stężenie ROS w komórce, które, uszkadzając DNA, przyczyniają się do powstawania mutacji [134]. Poprzez aktywację szlaku kinaz PI3K/mTOR kinaza BCR-ABL1 indukuje wzrost stężenia ROS w komórce [135]. Powstające między innymi wskutek działania ROS pęknięcia podwójnej nici DNA są niewydajnie naprawiane w tych komórkach w mechanizmie rekombinacji homologicznej (HRR, *homologous recombination repair*) i niehomologicznego łączenia końców (NHEJ, *non-homologous end joining*) [136].

Imatynib

Badania w celu odkrycia drobnocząsteczkowego inhibitora rodziny serynowo-treoninowych kinaz białkowych C doprowadziły do wyodrębnienia grupy cząsteczek będących pochodnymi fenylaminopirymidyny. Początkowo charakteryzowały się one słabą aktywnością i niską specyficznością, hamując aktywność kinaz zarówno tyrozynowych, jak i serynowo-treoninowych. W ramach poszukiwań inhibitora aktywności kinazowej receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*), cząsteczki te poddano następnie wielu zmianom strukturalnym w celu uzyskania optymalnej konformacji. Wprowadzenie pirydyny zwiększyło aktywność związku w komórce (ryc. 7). Dodanie grupy benzamidowej zapewniło aktywność w stosunku do kinaz tyrozynowych, natomiast podstawienie węgla w pozycji 6 pierścienia diaminofenyłowego grupą metylową zniósło całkowicie aktywność względem serynowo-treoninowych kinaz białkowych C. Poprawę biodostępności i rozpuszczalności w wodzie uzyskano przez dodanie silnie polarnego łańcucha bocznego (ryc. 7).

W trakcie badań okazało się, że jedna z zsyntetyzowanych pochodnych o nazwie CGP 57148 (STI571), obecnie znana pod nazwą metylosulfonianu imatynibu (IM, *imatinib mesylate*), hamuje aktywność kinazy tyrozynowej BCR-ABL1. W maju 2001 roku amerykańska Agencja do Spraw Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zatwierdziła IM, pod nazwami handlowymi Gleevec® i Glivec®, jako lek stosowany w terapii CML. Obecnie jest on również wykorzystywany do leczenia nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (GIST, *gastrointestinal stromal tumors*) związanych z wystąpieniem mutacji w genie dla kinazy c-KIT oraz w nowotworach mieloproliferacyjnych i limfoproliferacyjnych związanych z rearanżacją genu *PDGFR* [138].

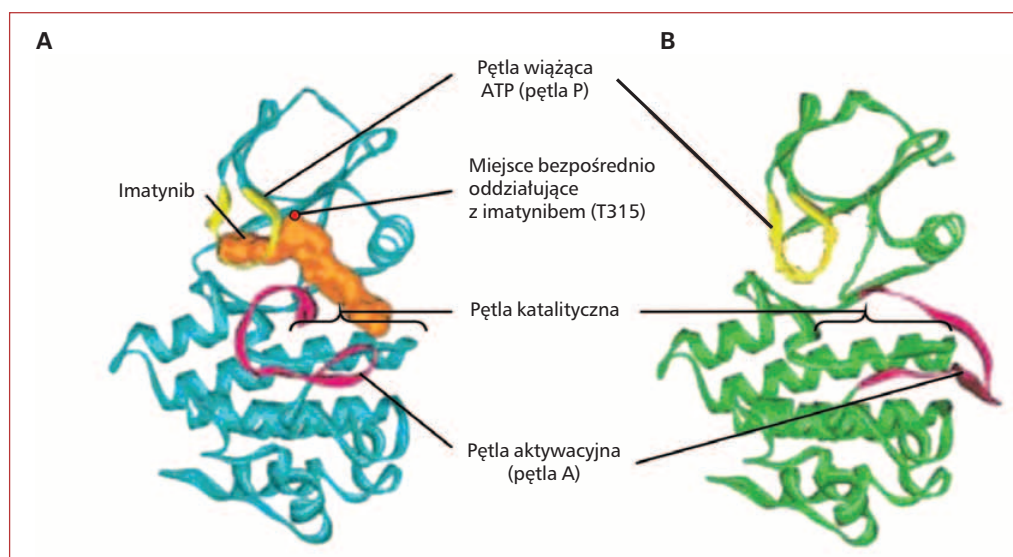


Rycina 7. Wzór strukturalny metylosulfonianu imatynibu — 4-[[[4-Methyl-1-piperazynyl)metyl]-N-[4-metyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-henyl] benzamid metanesulfonate. Zaznaczono wybrane elementy optymalizujące działanie cząsteczki: pirydyna (A), benzamid (B), grupa metylowa (C) oraz N-metylopiperazyna (D). Zmodyfikowano według [137]

Figure 7. Structural formula of imatinib metyselate — 4-[[[4-Methyl-1-piperazynyl)metyl]-N-[4-metyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-henyl] benzamid methane-sulfonate. Molecular optimization elements: pyridyl group (A), benzamido group (B), “flag methyl” group (C) and N-methylpiperazine (D). Modified according to [137]

Właściwości farmakologiczne

Imatynib jest syntetycznym, drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej, o wzorze sumarycznym C₂₉H₃₁N₇O • CH₃SO₃H i masie molowej 589,7 g/mol (ryc. 7). Hamuje aktywność kinazową wszystkich form kinazy ABL1 (c-ABL, v-ABL, BCR-ABL1, TEL-ABL), a także kinazy c-KIT, będącej receptorem dla czynnika wzrost owego komórek macierzystych (SCF, *stem-cell factor*) oraz PDGFR. Jest związkiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie, o pH równym 5,5 lub niższym [139]. Dostępność biologiczna leku wynosi 98%. Z badań farmakokinetycznych wynika, że maksymalne stężenie związku w osoczu pacjentów, którym podaje się IM w dawce 400 mg na dobę, oscyluje między 2,13 μM a 4,6 μM, a czas połowiczny rozpadu związku wynosi 19,3 godziny [140]. Imatynib jest metabolizowany w wątrobie, głównie przez CYP3A4 — enzym z rodziny cytochromu P450 (CYP). Głównym metabolitem jest N-desmetyl — piperazynowa pochodna, której aktywność *in vitro* jest zbliżona do aktywności inhibitora. Imatynib, głównie w formie metabolitów, jest wydalany przede wszystkim z kałem, częściowo z moczem [138].



Rycina 8. Struktura przestrzenna domeny kinazowej BCR-ABL1 w konformacji nieaktywnej związanej z imatynibem (A) i aktywnej (B). Zmodyfikowano według [142]

Figure 8. Ribbon representation of BCR-ABL1 kinase domain in inactive conformation in complex with imatinib (A) and in active conformation (B). Modified according to [142]

Mechanizm działania

Domeny katalityczne eukariotycznych tyrozynowych i serynowo-treoninowych kinaz są wysoce konserwowane ewolucyjnie zarówno w sekwencji aminokwasowej, jak i w strukturze przestrzennej. Mają strukturę dwupłatową — część N-końcowa ma strukturę drugorzędową w formie β -harmonijki i α -helisy, natomiast C-końcowa część jest w większości helikalna. W obszarze łączenia się obu części domeny katalitycznej znajduje się grupa wysoce konserwowanych ewolucyjnie reszt aminokwasowych tworzących miejsce wiązania cząsteczki ATP, tak zwana pętla P (*P-loop*), i miejsce katalityczne [141]. Pozostałe dwa regiony wyodrębnione w domenie katalitycznej to obszar białka w obrębie treoniny 315 (obszar kontaktu IM z domeną) oraz obszar w obrębie pętli aktywacyjnej, tak zwana pętla A (*A-loop*) [142] (ryc. 8). Stan aktywacji kinazy BCR-ABL1 zależy od położenia pętli aktywacyjnej. W aktywnej kinazie pętla A jest w konformacji aktywnej, nazywanej „otwartą”, ponieważ region wiążący ATP jest odsunięty od centrum katalitycznego kinazy [143]. W konformacji nieaktywnej, „zamkniętej”, pętla A blokuje centrum katalityczne kinazy dla substratów [144]. Aktywacja kinazy następuje w wyniku fosforylacji tyrozyny występującej w pętli aktywacyjnej (w przypadku kinazy ABL1 i BCR-ABL1 jest to tyrozyna 393 w domenie SH1), w wyniku czego kwas asparaginowy znajdujący się w sekwencji Asp-Phe-Gly ulega przemieszczeniu

tak, że może oddziaływać z jonami Mg^{2+} . Jony magnezu uczestniczą w wiązaniu cząsteczki ATP, a C-końcowy fragment pętli A odgrywa rolę „platformy” umożliwiającej wiązanie substratu [143]. Konformacja aktywna pętli A jest wysoce konserwowana ewolucyjnie w obrębie kinaz *Eukariota*, natomiast konformacja nieaktywna jest w istotny sposób zróżnicowana między poszczególnymi białkami [143].

Imatynib wiąże się jedynie z nieufosforylowaną, nieaktywną formą kinazy BCR-ABL1 [141], dzięki czemu charakteryzuje się znaczną swoistością działania. Początkowo uważano, że działa przez współzawodnictwo z cząsteczką ATP o miejsce wiązania w pętli wiążącej ATP. Obecnie wiadomo, że jedynie niewielki fragment inhibitora — pierścienie pirydynowy i pirymidynowy — znajdują się w regionie pętli P. Większość cząsteczki IM jest wciśnięta w centralny region kinazy, między pętlę aktywacyjną i α -helisę. Towarzyszy temu powstanie sześciu wiązań wodorowych oraz licznych oddziaływań typu van der Waalsa, które stabilizują kompleks IM–kinaza w konformacji nieaktywnej, niezdolnej do wiązania ATP [141]. Związanie IM skutkuje hamowaniem autofosforylacji kinazy BCR-ABL1 i fosforylacji jej substratów, co powoduje zablokowanie proliferacji komórek oraz indukcję apoptozy.

Badania przedkliniczne

W doświadczeniach przeprowadzonych na wyizolowanych białkach dowiedziono, że IM skutecz-

nie hamuje aktywność kinazową różnych form kinazy ABL1 — c-ABL, v-ABL oraz BCR-ABL1 [145, 146]. Stężenie IM w układzie bezkomórkowym, powodujące obniżenie poziomu fosforylacji dodanego substratu w 50% (IC_{50} , 50% *inhibitory concentration*), wynosiło 0,025–0,038 μM .

Hamowanie aktywności kinazowej przez IM, wykazane w układzie bezkomórkowym, potwierdzono w badaniach nad działaniem tego związku w komórkach *in vitro*. Imatynib powodował zmniejszenie autofosforylacji kinaz c-ABL, v-ABL, TEL-ABL oraz BCR-ABL1; IC_{50} inhibitora wynosiło 0,1–0,3 μM [146, 147]. Podobne stężenie IM okazało się wystarczające do zahamowania aktywności kinazowej PDGFR, a także kinazy c-KIT [148].

W badaniach przeprowadzonych na różnorodnych liniach komórkowych z wprowadzonym genem dla kinazy BCR-ABL1 wykazano, że IM hamuje ich proliferację i indukuje apoptozę na poziomie IC_{50} zbliżonym do wartości potrzebnej do zahamowania fosforylacji komórkowej. Jednocześnie nie hamuje wzrostu komórek, do których nie wprowadzono genu *BCR-ABL1* [149]. Wyniki te potwierdzono na wielu liniach komórkowych p210^{BCR/ABL} i p190^{BCR/ABL} — pozytywnych pochodzących od chorych na CML oraz ALL z obecnym chromosomem Ph [150–152].

W badaniach przeprowadzonych *in vivo* IM podawany dootrzewnowo raz na dobę w dawce 50 mg/kg mc. spowodował zatrzymanie wzrostu stransfekowanych genem dla kinazy v-ABL komórek po wszczepieniu ich myszom [146]. Obserwowano także zależne od dawki IM zahamowanie wzrostu BCR-ABL1 pozytywnych komórek po wszczepieniu ich myszom, jednak podawanie tego inhibitora raz na dobę nie zlikwidowało guza [149]. Późniejsze doświadczenia dowiodły, że IM podawany myszom 3 razy na dobę, zarówno dootrzewnowo w dawkach po 50 mg/kg mc., jak i doustnie po 160 mg/kg mc., powoduje całkowity zanik guza powstałego po wszczepieniu komórek pochodzących od osób chorych na CML w fazie kryzy blastycznej [153]. Podawanie zwierzętom IM w odstępach 8-godzinnych okazało się konieczne ze względu na dość krótki czas połowicznego rozpadu tego inhibitora u myszy. Pojedyncza dawka IM pozwala na zatrzymanie aktywności kinazowej białka BCR-ABL1 do 50% na około 4 godziny [153]. Jedynie ciągłe blokowanie aktywności kinazy BCR-ABL1 pozwala na osiągnięcie oczekiwanych efektów biologicznych *in vivo*.

Badania kliniczne

W lipcu 1998 roku rozpoczęto I fazę badań klinicznych, których głównym celem było ustalenie maksymalnej bezpiecznej dla człowieka dawki IM,

a także zbadanie aktywności przeciwnowotworowej inhibitora [154]. Do badań włączano chorych na CML w przewlekłej fazie choroby, u których leczenie IFN α okazało się nieskuteczne. Imatynib podawano w dawkach 25–1000 mg na dobę, z których wszystkie okazały się względnie dobrze tolerowane. Całkowitą odpowiedź hematologiczną (CHR, *complete hematologic response*), definiowaną jako zmniejszenie liczby leukocytów poniżej 10 000/mm³ i płytek krwi poniżej 450 000/mm³, zaobserwowano u 98% pacjentów otrzymujących dawkę IM 300 mg i więcej. Mniejszą (redukcja widocznych w płycie metafazalnej komórek szpiku kostnego chromosomów Ph do 65%) lub większą (do 35%) odpowiedź cytogenetyczną (CyR, *cytogenetic response*) zaobserwowano u ponad połowy chorych otrzymujących IM w dawce 300 mg i więcej [154].

Badania I fazy rozszerzono rok później, włączając do próby chorych na CML w fazie kryzy blastycznej oraz chorych na ALL z obecnym chromosomem Ph [155]. Imatynib stosowano w dawkach od 300–1000 mg na dobę. Pięćdziesiąt pięć procent pacjentów w fazie kryzy blastycznej odpowiedziało na leczenie IM obniżeniem liczby niedojrzałych komórek w szpiku kostnym poniżej 15%, a 11% odpowiadało kryteriom CHR. Wśród chorych na ALL powyższe kryteria spełniało odpowiednio 70% i 20% pacjentów [155].

Do wieloośrodkowych badań II fazy włączano chorych na CML w przewlekłej fazie choroby, u których leczenie IFN α okazało się nieskuteczne [156], a także osoby w fazie akceleracji [157] oraz kryzy blastycznej [158]. Spośród chorych w fazie przewlekłej 96% uzyskało CHR, a 67% — większą odpowiedź cytogenetyczną (MCyR, *major cytogenetic response*), natomiast 44% pacjentów po 6 latach od rozpoczęcia badań kontynuowało terapię IM [159]. Sześćoletnie przeżycie bez progresji choroby oszacowano na 61%, a szanse na przeżycie w tym czasie — na 76%. Wyniki te wskazują na znaczącą skuteczność IM u pacjentów rozpoczynających leczenie tym inhibitorem w późnej fazie przewlekłej choroby.

W lipcu 2000 roku rozpoczęto wieloośrodkowe, randomizowane badania III fazy — IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*), mające na celu ocenę skuteczności leczenia IM w porównaniu z podawaniem IFN α w połączeniu z małymi dawkami cytarabiny (Ara-C) [160]. Do badań włączano nowo diagnozowanych chorych w fazie przewlekłej CML. Pacjenci otrzymywali IM w dawce 400 mg na dobę. Po 2 latach od rozpoczęcia badań CHR osiągnęło 95% chorych leczonych IM i 56% leczonych IFN α w połączeniu z Ara-C, na-

tomiast MCyR uzyskało odpowiednio 85% i 22% chorych [160]. Dalsze prowadzenie badań w tej formie stało się niemożliwe w związku ze zmianą terapii chorych leczonych IFN α na podawanie IM. Po 8 latach obserwacji 304 pacjentów (55%) nadal otrzymuje IM. Przewidywany czas przeżycia bez zdarzeń, czas bez progresji do fazy akceleracji i kryzy blastycznej oraz całkowity czas przeżycia chorych wynoszą odpowiednio 81%, 92% i 85% [161]. Rok po rozpoczęciu badań IRIS wśród 74% pacjentów, którzy uzyskali całkowitą odpowiedź cytogenetyczną (CCyR, *complete cytogenetic response*), 57% osiągnęło 3-log. redukcję poziomu transkryptu BCR-ABL1, jednak tylko 4–10% osiągnęło remisję molekularną, definiowaną jako brak transkryptów BCR-ABL1 wykrywanych metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (RQ-PCR, *real-time quantitative polymerase chain reaction*) [162].

Utrzymanie remisji choroby wymaga jednak stałego podawania IM. Przerwanie terapii, nawet po uzyskaniu całkowitej remisji molekularnej, zazwyczaj już po kilku miesiącach prowadzi do nawrotu choroby [163–166]. Czułość RQ-PCR pozwala na wykrycie mRNA nawet z jednej komórki na 10⁵ komórek pobranych do analizy [167]. Mimo negatywnego wyniku wśród 10¹² komórek szpiku nadal może pozostawać około 10⁵–10⁶ komórek BCR-ABL1-pozytywnych [168], co może być związane z progresją CML po odstawieniu IM.

Oporność na imatynib

Mimo wysokiej skuteczności IM w leczeniu CML rozwój oporności na ten inhibitor oraz pozostająca choroba resztkowa stały się istotnym problemem klinicznym. Oporność na IM można sklasyfikować ze względu na czas jej pojawienia się w trakcie leczenia na pierwotną i wtórną. Pierwotna oporność występuje, gdy IM nie jest skuteczny od początku terapii i stwierdza się brak odpowiedzi hematologicznej lub cytogenetycznej na leczenie. Wtórna oporność wiąże się z utratą skuteczności działania IM po wcześniejszym uzyskaniu odpowiedzi na leczenie tym inhibitorem. Oporność na IM częściej występuje w zaawansowanym stadium choroby [169].

Mechanizmy oporności

Zarówno pierwotna, jak i wtórna oporność na IM może być spowodowana działaniem podobnych mechanizmów, jednak niektóre z nich są częściej związane z jedną lub drugą opornością. Mechanizmy farmakologiczne, takie jak biodostępność, wchłanianie leku i interakcja z innymi lekami oraz mechani-

zmy komórkowe, wynikające z zaburzonego pobierania/eliminacji IM do/z komórek czy wiązania z białkami błonowymi, są charakterystyczne dla oporności pierwotnej. Natomiast w oporności wtórnej najczęściej identyfikowane są mechanizmy molekularne, takie jak selekcja klonu komórek białaczkowych z mutacją w domenie kinazowej, nadekspresja BCR-ABL1 czy pojawienie się alternatywnych ścieżek przekazywania sygnału [170].

Mutacje punktowe w domenie kinazowej ABL1

Pojawienie się i selekcja klonów komórek z mutacjami punktowymi w domenie kinazowej ABL1 jest najczęściej spotykanym mechanizmem prowadzącym do oporności wśród chorych leczonych IM. Odpowiada on za 42–90% przypadków stwierdzonej oporności, a ocena ta zależy od metodologii badania, definicji oporności i fazy choroby [171]. Wydaje się, że IM nie indukuje powstawania mutacji w domenie kinazowej ABL1 komórek, a jedynie prowadzi do selekcji klonów komórek z mutacją powstałą przed podaniem inhibitora [172, 173], między innymi wskutek działania ROS [174]. Mutacje są także wykrywane u chorych, u których CCyR jest stabilna [175].

W komórkach pochodzących od chorych na CML wykryto ponad 70 różnych mutacji punktowych, powstających w wyniku zamiany 50 aminokwasów w obrębie domeny kinazowej ABL1 [176]. Różne podstawienia aminokwasowe tej samej reszty, na przykład F317C, F317L lub F317V, nadają kinazie różną wrażliwość na IM [177]. Spośród wszystkich zidentyfikowanych mutacji 15 aminokwasowych podstawień odpowiada za 85%, a 6 najczęstszych miejsc podstawień (T315, Y253, E255, M315, G250, F359) — za 66% stwierdzanych mutacji [177]. Wśród mutacji można wyróżnić cztery grupy zlokalizowane w obrębie domeny kinazowej: w regionie wiązania IM do kinazy, w obrębie miejsca wiązania ATP (pętli P), pętli aktywacyjnej (pętli A) i domeny katalitycznej [176] (ryc. 8). Mogą wystąpić także mutacje rozproszone w całej części białka, które zmieniają konformację białka w sposób utrudniający wiązanie IM [178].

Pierwszą wykrytą mutacją w domenie kinazowej ABL1 było podstawienie treoniny w pozycji 315 izoleucyną (T315I) w rejonie odpowiedzialnym za bezpośrednie wiązanie IM [179]. Brak atomu tlenu w łańcuchu bocznym treoniny 315 uniemożliwia powstanie stabilizującego wiązania wodorowego z grupą aminową IM [144]. Dodatkowo izoleucyna, przez hydrofobowy łańcuch boczny, zmienia przestrzennie miejsce wiązania IM, uniemożliwiając

związanie się inhibitora [179]. Mutacja T315I prowadzi do całkowitej oporności na IM, a także na inhibitory II generacji (dazatynib i nilotynib), i nie zostaje zniesiona zwiększeniem dawki IM [179]. Jednocześnie aktywna kinaza z tą mutacją nadal może fosforylować białka w szlakach przekazywania sygnału, w których uczestniczy.

Pętla P, odpowiadająca za wiązanie cząsteczki ATP, po przyłączeniu IM przez kinazę stabilizuje wiązanie inhibitora dzięki mostkom wodorowym między tyrozyną w pozycji 253 (Y253) a asparaginą w pozycji 322 (N322). Tworzą one hydrofobową klatkę częściowo otaczającą IM. Mutacja tyrozyny 253 prowadzi do zniszczenia wiązania wodorowego, co uniemożliwia przyłączenie IM [144]. Inne mutacje w obrębie pętli P prowadzą do preferencyjnego utrzymywania przez kinazę BCR-ABL1 konformacji aktywnej, z którą inhibitor nie może się wtedy związać [180]. Wydaje się, że chorzy z mutacjami w obrębie pętli P mają zdecydowanie gorsze rokowanie niż chorzy z mutacjami w innych obszarach [181].

Ułożenie pętli A reguluje aktywność kinazy BCR-ABL1. Mutacje w pętli A nadają komórkom umiarkowaną oporność na IM [182, 183]. Autofosforylacja tyrozyny 393 stabilizuje kinazę w konformacji aktywnej, sprawiając, że trudniej wiąże IM [144]. Jest zatem prawdopodobne, że mutacje w pętli A uniemożliwiają przyjęcie przez kinazę nieaktywnej konformacji, potrzebnej do związania cząsteczki IM [142]. W konformacji nieaktywnej tyrozyna 393 naśladuje resztę tyrozynową białkowego substratu BCR-ABL1, blokując centrum katalityczne kinazy dla substratów. Mutacje w pętli A, nadające oporność na IM, na przykład podstawienie histydyny 396 (H396), mogłyby także utrudniać stabilizację zamkniętej konformacji [184].

Kolejna grupa mutacji, wśród nich podstawienie metioniny w pozycji 351 (M351), występuje w obrębie domeny katalitycznej kinazy — regionu, który stanowi podstawę dla pętli aktywacyjnej i ułatwia stabilizację nieaktywnej konformacji kinazy BCR-ABL1. Mutacje te prowadzą to preferencyjnego przyjęcia aktywnej konformacji przez kinazę i utrudniają wiązanie IM. Mutacja M351T prowadzi do umiarkowanej oporności, która u chorych na CML może być zniesiona dzięki zwiększeniu dawki IM [184].

Nadekspresja genu i białka BCR-ABL1

Nadekspresję białka BCR-ABL1, spowodowaną powieleniem genu dla tej kinazy, najpierw zaobserwowano *in vitro* w opornych na IM komórkach, które uzyskano w hodowli przy zwiększaniu stężenia inhibitora [185–187]. Zjawisko to potwier-

dzono *in vivo*; dotyczyło około 18% chorych na CML opornych na leczenie IM [179]. Nadekspresja BCR-ABL1 prowadzi do oporności, ponieważ większa ilość białkowej kinazy musi zostać zahamowana stosowanym w praktyce klinicznej stężeniem IM. Amplifikacja genu jest prawdopodobnie wynikiem niestabilności genetycznej, a jej częstotliwość jest szacowana na 10^{-4} na podział komórki, natomiast częstotliwość wystąpienia mutacji punktowej ocenia się na 10^{-9} na podział komórki [177]. Jednak kliniczna oporność na IM jest znacznie częściej spowodowana mutacjami punktowymi w domenie kinazowej ABL1 niż powieleniem genu kinazy BCR-ABL1. Nadekspresja białka BCR-ABL1 może być szkodliwa dla komórek. Linie komórkowe ze zwiększoną ilością onkogennej kinazy charakteryzowały się szybką utratą żywotności i zmniejszeniem proliferacji, gdy IM wycofano ze środowiska hodowlanego [188].

Alternatywne szlaki przekazywania sygnału

Działanie IM aktywuje szlak PI3K/Akt/mTOR *in vitro* w komórkach z ekspresją kinazy BCR-ABL1 oraz *in vitro* i *in vivo* w komórkach pobranych od chorych na CML [189]. Jego aktywacja okazała się zasadnicza dla przeżycia komórek w czasie rozwoju wczesnej oporności na stosowany inhibitor, poprzedzającej pojawienie się pełnych oznak oporności, na przykład mutacji punktowych. Przez zahamowanie indukowanej IM aktywacji szlaku kinazy Akt działaniem inhibitorów mTOR i siRNA specyficznego dla Akt, rozwój początkowej oporności może zostać odwrócony [189]. Także wtórna oporność może się wiązać z uruchomieniem szlaków sygnałowych niezależnych od BCR-ABL1. W opornych na IM komórkach CML dochodzi do nadekspresji i aktywacji kinazy Lyn, należącej do rodziny kinaz Src. Zahamowanie aktywności tej kinazy inhibitorem dla kinaz Src powoduje ograniczenie przeżycia i proliferacji komórek opornych, ale nie komórek wrażliwych na IM [190]. Analiza mikromacierzy DNA wykazała korelującą z fenotypem oporności na IM ekspresję 39 genów, zaangażowanych w procesy antyapoptotyczne i transformację nowotworową. Kilka spośród tych genów może być związanych z aktywacją alternatywnych ścieżek przekazywania sygnału w komórkach BCR-ABL1-dodatnich [191].

Zróźnicowana biodostępność i zaburzone wchłanianie/wydalenie imatynibu

W badaniach farmakokinetyki IM wykazano istotną różnicę stężenia tego leku we krwi u różnych chorych [140]. Imatynib jest w znacznej mie-

rze metabolizowany przez izoenzym 4A cytochromu P450 (CYP3A4), którego aktywność różni się u poszczególnych osób [192], co częściowo wyjaśnia osobnicze zróżnicowanie stężenia inhibitora w osoczu. Średnie stężenie IM w osoczu jest wyższe u chorych, którzy osiągnęli lepsze wyniki leczenia, CCyR czy większą odpowiedź molekularną (MMoR, *major molecular response*) niż pacjenci, u których odpowiedź na IM była słabsza [193].

Zróżnicowane stężenie IM w komórkach wynika także ze zjawiska oporności wielolekowej (MDR, *multidrug resistance*), które jest jednym z mechanizmów broniących komórki macierzyste przed czynnikami genotoksycznymi, a komórki nowotworowe — przed skutkami chemioterapii. Komórkę nowotworową przed wniknięciem leków zabezpieczają białka transbłonowe należące do nadrodziny białek ABC z domeną wiążącą nukleotydy (*ATP-binding cassette*). Produktem genu *MDR1* jest między innymi glikoproteina P (Pgp) — zależna od ATP pompa redukująca wewnątrzkomórkowe stężenie leku, prowadząc w ten sposób do jego zbyt niskiego stężenia w komórce [194]. Imatynib jest substratem glikoproteiny P i wewnątrzkomórkowe stężenie tego inhibitora jest znacznie niższe w komórkach z ekspresją Pgp [195–197]. Oporne na IM linie komórkowe CML, otrzymane przez ekspozycję na wzrastające stężenie inhibitora, wykazywały nadekspresję Pgp [185]. Nie stwierdzono nadekspresji Pgp u opornych na IM chorych na CML. Jednak dodanie inhibitora pompy Pgp do hodowli komórek pobranych od osób z CML opornych na IM spowodowało znaczące zmniejszenie zdolności do tworzenia kolonii, co sugeruje, że nadekspresja *MDR1* może odgrywać istotną rolę w klinicznej oporności na IM [198].

Drugą pompą regulującą wewnątrzkomórkowe stężenie leku jest inny transporter z rodziny ABC — BCRP/ABCG2 (*brest cancer resistance protein*). Nadekspresja białka ABCG2, związana z działaniem IM, prowadzi do usunięcia tego inhibitora z komórki [199, 200].

Transporterem, który wprowadza IM do komórek, jest hOCT1 (*human organic cation transporter 1*). Jego zahamowanie prowadzi do utrzymywania się zbyt niskiego stężenia IM w komórkach, co może prowadzić do oporności na ten lek [197, 201]. Gen dla hOCT1 ulega znacznie większej ekspresji u chorych na CML, którzy osiągnęli CCyR, niż u osób, u których po 10 miesiącach leczenia nadal pozostawało więcej niż 65% metafaz z chromosomem Ph [202].

Wiązanie imatynibu do białek błonowych

Stężenie IM w osoczu u chorych przyjmujących lek w dawce 400 mg na dobę powinno być znacznie wyższe od stężenia inhibitora potrzebnego do za-

hamowania aktywności kinazowej białka BCR-ABL1 [177]. Imatynib we krwi jest w około 95% wiązany z białkami, głównie z albuminą i α_1 -kwaśną glikoproteina (AGP, *α_1 -acid glycoprotein*), a jedynie niezwiązany z białkami lek może spełniać w komórce funkcje inhibitora kinaz [203]. Ilość IM wiązana przez albuminę jest znacznie większa niż przez AGP. Istnieje pozytywna korelacja między stężeniami AGP i IM w komórce [204]. Zablockowanie wiązania IM do AGP przez dodanie erytromycyny, która wiąże się do AGP, przywraca wrażliwość na inhibitor [205]. Rola AGP w rozwoju oporności na IM nie jest ostatecznie ustalona [206].

Komórki macierzyste CML

Imatynib nie powoduje usunięcia z organizmu chorego wszystkich komórek BCR-ABL1-dodatkowych, nawet w przypadku osiągnięcia całkowitej odpowiedzi molekularnej (CMoR, *complete molecular response*). Po odstawieniu leku u części pacjentów następuje nawrót choroby już po kilku miesiącach od przerwania terapii [164, 166, 168]. Może to być spowodowane pozostawianiem macierzystych komórek nowotworowych. Stanowią one mniej niż 1% progenitorowych komórek CD34⁺. Charakteryzują się brakiem na swojej powierzchni antygenu CD38 oraz są w fazie spoczynkowej cyklu (faza G₀) [207].

Macierzyste komórki CML mają wiele cech, które nadają im oporność na IM. Ilość transkryptu mRNA kinazy BCR-ABL1 jest 100 razy większa niż w zróżnicowanych komórkach CD34⁺ CML; kilkukrotnie zwiększona jest ilość kinazy BCR-ABL1, a także jej aktywność, mierzona poziomem fosorylacji białka Crk1 [208]. Komórki CD34⁺ CD38⁺ charakteryzują się także zwiększoną ekspresją białek związanych z obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia leku (Pgp) oraz zmniejszoną ekspresją białek związanych z transportem substancji do komórki (hOCT-1) [208].

Niewrażliwość komórek macierzystych CML na IM jest wiązana także z tym, że komórki te są poza cyklem komórkowym. Chociaż zablokowanie dojrzających BCR-ABL1-pozytywnych komórek w cyklu komórkowym nie zmniejsza ich wrażliwości na IM [209], to dodanie czynników wzrostu do niedzieliących się progenitorowych komórek CML powoduje ich uwrażliwienie na działanie IM [210, 211]. Macierzyste komórki CML CD34⁺ CD38⁺ są także rezerwuarem komórek z mutacjami nadającymi oporność na IM [212].

Pokonywanie oporności na imatynib

Skuteczność terapii stosowanej w leczeniu CML w dużej mierze zależy od podjęcia decyzji

o zmianie sposobu terapii w optymalnym dla chorego czasie. W związku z tym ustalono punkty czasowe, w których uzyskana odpowiedź na leczenie IM jest satysfakcjonująca, oraz definicje niepowodzenia i suboptymalnej odpowiedzi na to leczenie [171, 213].

Niepowodzenie w terapii IM oznacza, że jej kontynuacja tym inhibitorem w stosowanej dawce nie jest właściwa dla chorego, który prawdopodobnie uzyska więcej korzyści dzięki innym metodom leczenia. Istnieje kilka sposobów mogących pomóc w pokonaniu oporności i uzyskaniu poprawy terapeutycznej. Należą do nich: zwiększenie dawki IM, zamiana IM na inhibitory kinazy tyrozynowej II generacji, allogeniczne przeszczepienia macierzystych komórek krwiotwórczych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) lub udział chorego w badaniach klinicznych z użyciem nowych inhibitorów kinaz.

Zwiększenie dawki imatynibu

W przypadku pojawienia się klonów komórkowych z mutacjami nadającymi częściową oporność na IM zwiększenie dziennej dawki tego inhibitora może przynieść poprawę odpowiedzi na terapię u chorych dobrze tolerujących dotychczasową dawkę leku. Także chorzy, u których oporność na IM wynika z nadekspresji kinazy lub zaburzeń transportu leku do i z komórki, mogą odnieść korzyści ze zwiększenia dawki inhibitora [171, 214].

Zwiększenie dawki IM do 600 lub 800 mg na dobę u opornych pacjentów w fazie przewlekłej CML prowadzi do osiągnięcia hematologicznej i cytogenetycznej odpowiedzi na leczenie [215]. Większa niż standardowa dawka IM (600 mg/d.) stosowana u osób w fazie kryzy blastycznej wiąże się z częstszym uzyskiwaniem hematologicznej i cytogenetycznej odpowiedzi także w zaawansowanym stadium choroby [158]. Poprawa odpowiedzi wynikająca ze zwiększonej dawki IM nie wydaje się jednak korzyścią trwałą i wcześniej lub później wymaga zmiany sposobu leczenia [216].

Nowe inhibitory kinazy tyrozynowej

Dazatynib to drobnocząsteczkowy inhibitor zatwierdzony w 2006 roku przez FDA (pod nazwą Sprycel) w leczeniu chorych z CML i ALL z obecnym chromosomem Ph, opornych na IM. Lek ten jest strukturalnie odmiennym związkiem od IM i może się wiązać zarówno z aktywną, jak i z nieaktywną formą kinazy BCR-ABL1 [217, 218]. Dazatynib, oprócz kinaz hamowanych przez IM, hamuje także aktywność kinaz z rodziny Src (Src, Lck), blokując tym samym część alternatywnych dla BCR-ABL1 szlaków przekazywania sygnału [219]. Nowy

inhibitor blokuje także szlak przekazywania sygnałów poprzez STAT5, prowadząc do indukcji apoptozy w komórkach z ekspresją kinazy BCR-ABL1 [220]. Aktywność dazatynibu względem kinazy BCR-ABL1 *in vitro* jest około 300 razy większa niż aktywność IM [219]. Dazatynib w większym niż IM stopniu hamuje, mierzoną poziomem fosforylacji Crkl, aktywność kinazy BCR-ABL1 w macierzystych komórkach CML (CD34⁺CD38⁻), nie powoduje jednak śmierci nieproliferujących komórek macierzystych [221]. Dazatynib nie jest także skutecznym w przypadku wystąpienia mutacji T315I [219].

Strukturalną pochodną IM jest kolejny, stosowany w leczeniu chorych na CML po nieskutecznej terapii IM, drobnocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej — nilotynib. Nilotynib wiąże się z kinazą BCR-ABL1, tak jak IM w konformacji nieaktywnej, jednak jego aktywność, mierzona poziomem fosforylacji Crkl, jest kilkadziesiąt razy większa [222]. Stężenie nilotynibu w komórkach, w przeciwieństwie do stężenia IM, nie wydaje się związane ze zmianami aktywności transportera hOCT1 [201]. Jednak podobnie jak IM, nilotynib nie prowadzi do apoptozy macierzystych komórek CML (CD34⁺CD38⁻) [223]. Kinaza BCR-ABL1 z mutacją T315I także nie jest wrażliwa na ten inhibitor [224].

Pewną szansą dla chorych opornych na IM i inhibitory II generacji, niekwalifikujących się do allo-HSCT, jest udział w badaniach klinicznych nowych inhibitorów. Jednym z nich jest bosutynib (SKI-606), który — podobnie jak dazatynib — jest podwójnym inhibitorem kinaz ABL1 i SRC, jednak w odróżnieniu od dazatynibu nie wiąże się z receptorami c-KIT i PDGFR [225]. Podobnie jak stosowane już w praktyce klinicznej inhibitory kinazy BCR-ABL1, bosutynib nie wykazuje aktywności wobec klonów komórkowych z mutacją T315I [225, 226].

Kolejnym inhibitorem kinaz z rodziny Src w fazie badań klinicznych jest INNO-406 (NS-187). Hamuje on kinazę ABL1 kilkadziesiąt razy silniej niż IM, a dodatkowo jest także inhibitorem białka Lyn [227, 228] odgrywającego istotną rolę w transformacji blastycznej CML i rozwoju oporności na IM związanej z alternatywnymi szlakami przekazywania sygnału.

W związku z niską aktywnością inhibitorów kinazy BCR-ABL1 wobec klonów komórkowych z mutacją T315I poszukuje się inhibitorów o innym mechanizmie działania. Jednym z nich jest ON012380, który nie wiąże się z kinazą BCR-ABL1 w miejscu wiązania IM, blokuje natomiast miejsce wiązania substratów z kinazą. Związek ten powoduje indukcję apoptozy w komórkach z ekspresją znanych mutacji nadających oporność na IM i inne inhibito-

ry blokujące wiązanie ATP przez kinazę BCR-ABL1 — także mutacji T315I [229].

MK-0457 (VX-680) jest inhibitorem kinaz serynowo-treoninowych z rodziny Aurora — kluczowych w regulacji segregacji chromosomów podczas mitozy [230]. Hamuje także aktywność kinazy BCR-ABL1, także w wersji z mutacją T315I *in vitro* [231] oraz u chorych na CML z ekspresją kinazy BCR-ABL1 z mutacją T315I [232]. MK-0457 wiąże się z kinazą BCR-ABL1 za pomocą czterech mostków wodorowych i nie wymaga interakcji z tyrozyną w pozycji 315 [233].

Podziękowania

Praca powstała podczas realizacji grantu NN401 039037 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz projektu pn. „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” POIG 01.01.02–00–109/09 współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007–2013.

Piśmiennictwo

- Geary C.G. The story of chronic myeloid leukemia. *Br. J. Haematol.* 2000; 110: 2–11.
- Nowell P., Hungerford D. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 1960; 25: 85–109.
- Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290–293.
- Bartram C.R., de Klein A., Hagemeijer A. i wsp. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1983; 306: 277–280.
- Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N. i wsp. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984; 36: 93–99.
- Daley G.Q., Van Etten R.A., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824–830.
- Heisterkamp N., Jenster G., ten Hoeve J., Zovich D., Pattengale P.K., Groffen J. Acute leukemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 1990; 344: 251–253.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6: 372–375.
- Tefferi A., Skoda R., Vardiman J.W. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009; 6: 627–637.
- Sverdlov S.H., Campo E., Harris N.L. i wsp. (red.). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon 2008: 10–13.
- Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. i wsp. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.
- Arslan M.A., Kutuk O., Basaga H. Protein kinases as drug targets in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 2006; 6: 623–634.
- Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96: 3343–3356.
- Kurzrock R., Kantarjian H.M., Druker B.J., Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemia: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 2003; 138: 819–830.
- Pendergast A.M. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv. Cancer Res.* 2002; 85: 51–100.
- Farrazi T.A., Waksman G., Gordon J. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 39501–39504.
- Hantschel O., Nagar B., Guettler S. i wsp. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 2003; 112: 845–857.
- Hantschel O., Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 33–44.
- Taagepera S., McDonald D., Loeb J.E. i wsp. Nuclear-cytoplasmic shuttling of c-Abl tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 7457–7462.
- David-Cordonnier M.H., Hamdane M., Bailly C., D'Halluin J.C. The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures. *Biochemistry* 1998; 37: 6065–6076.
- Lewis J.M., Baskaran R., Taagepera S., Schwartz M.A., Wang J.Y. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 15174–15179.
- Van Etten R.A., Jackson P.K., Baltimore D., Sanders M.C., Matsudaira P.T., Janmey P.A. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J. Cell Biol.* 1994; 124: 325–340.
- Ito Y., Pandey P., Mishra N. i wsp. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 6233–6242.
- Frasca F., Vigneri P., Vella V., Vigneri R., Wang J.Y. Tyrosine kinase inhibitor STI571 enhances thyroid cancer cell motile response to hepatocyte growth factor. *Oncogene* 2001; 20: 3845–3856.
- Zipfel P.A., Grave M., Blackburn K., Fujimoto M., Tedder T.F., Pendergast A.M. The c-Abl tyrosine kinase is regulated downstream of the B cell antigen receptor and interacts with CD191. *J. Immunol.* 2000; 165: 6872–6879.
- Wetzler M., Talpaz M., Van Etten R.A., Hirsh-Ginsberg C., Beran M., Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1925–1939.
- Barila D., Superti-Furga G. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat. Genet.* 1998; 18: 280–282.
- Nagar B., Hantschel O., Young M.A. i wsp. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 2003; 112: 859–871.
- Shi Y., Alin K., Goff S.P. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995; 9: 2583–2597.
- Dai Z., Pendergast A.M. Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev.* 1995; 9: 2569–2582.
- Wen S.T., Van Etten R.A. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev.* 1997; 11: 2456–2467.

32. Sirvent A., Benistant C., Roche S. Cytoplasmic signaling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell* 2008; 100: 617–631.
33. Hantschel O., Wiesner S., Guttler T. i wsp. Structural basis for the cytoskeletal association of Bcr-Abl/c-Abl. *Mol. Cell*. 2005; 19: 461–473.
34. Woodring P.J., Hunter T., Wang J.Y.J. Inhibition of c-Abl tyrosine kinase activity by filamentous actin. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 27 104–27 110.
35. Woodring P.J., Hunter T., Wang J.Y.J. Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 2613–2626.
36. Plattner R., Kadlec L., DeMali K., Kazlauskas A., Pendergast A.M. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev.* 1999; 13: 2400–2411.
37. Furstoss O., Dorey K., Simon V., Barilà D., Superti-Furga G., Roche S. c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced *c-myc* expression and DNA synthesis. *EMBO J.* 2002; 21: 514–524.
38. Tatosyan A.G., Mizenina O.A. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry* 2000; 65: 49–58.
39. Van Etten R.A. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-ABL. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 179–186.
40. Shaul Y. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ.* 2000; 7: 10–16.
41. Yoshida K., Miki Y. Enabling death by the Abl tyrosine kinase. *Cell Cycle* 2005; 4: 777–779.
42. Yoshida K. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends Mol. Med.* 2008; 14: 305–313.
43. Tsuruta F., Sunayama J., Mori Y. i wsp. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2004; 23: 1889–1899.
44. Yoshida K., Yamaguchi T., Natsume T., Kufe D., Miki Y. JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biol.* 2005; 7: 278–285.
45. Weston C.R., Davis R.J. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; 19: 142–149.
46. Won J., Kim D.Y., La M., Kim D., Meadows G.G., Joe C.O. Clavage of 14-3-3 protein by caspase-3 facilitates Bad activation with Bcl-x(L) during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 19347–19351.
47. Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T. i wsp. 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 2058–2065.
48. Wang J.Y.J. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 2000; 19: 5643–5650.
49. Levav-Cohen Y., Goldberg Z., Zuckerman V., Grossman T., Haupt S., Haupt Y. C-Abl as a modulator of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 737–749.
50. Michael D., Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr. Opin. Genet. Development* 2002; 12: 53–59.
51. Fang S., Jensen J.P., Ludwig R.L., Vousden K.H., Weissman A.M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 8945–8951.
52. Goldberg Z., Sionov R.V., Berger M. i wsp. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.* 2002; 21: 3715–3727.
53. Yuan Z.M., Huang Y., Ishiko T. i wsp. Regulation of Rad51 function by c-ABL in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 3799–3802.
54. Yuan Z.M., Utsugisawa T., Huang Y. i wsp. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by c-Abl in the genotoxic stress response. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23485–23488.
55. Sun X., Majumder P., Shioya H. i wsp. Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 17 237–17 240.
56. Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 2343–2355.
57. Collins S., Coleman H., Groudine M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol. Cell. Biol.* 1987; 7: 2870–2876.
58. Croce C.M., Heubner K., Isobe M. i wsp. Mapping of four distinct BCR-related loci to chromosome region 22q11: order of BCR loci relative to chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia breakpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 7174–7178.
59. Heisterkamp N., Morris C., Groffen J. ABR, an active BCR-related gene. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17: 8821–8831.
60. Dhut S., Dorey E.L., Horton M.A., Ganesan T.S., Young B.D. Identification of two normal bcr gene products in the cytoplasm. *Oncogene* 1988; 3: 561–566.
61. Maru Y., Witte O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 1991; 67: 459–468.
62. Yart A., Mayeux P., Raynal P. Gab1, SHP-2 and other novel regulators of Ras: targets for anticancer drug discovery? *Curr. Cancer Drug Targets* 2003; 3: 177–192.
63. Jensen D.E., Rauscher F.J. BAP1, a candidate tumor suppressor protein that interacts with BRCA1. *Ann. NY Acad. Sci.* 1999; 886: 191–194.
64. Pendergast A.M., Muller A.J., Havlik M.H., Maru Y., Witte O.N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 1991; 66: 161–171.
65. McWhirter J.R., Galasso D.L., Wang J.Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 7587–7595.
66. Yiping H., Wertheim J.A., Lanwei X. i wsp. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood* 2002; 99: 2957–2968.
67. Kamps A.R., Hoffman C.R. G protein-coupled receptor roles in cell migration and cell death decisions. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005; 1049: 17–23.
68. Ron D., Zannini M., Lewis M. i wsp. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biologist* 1991; 3: 372–379.
69. Hart M.J., Eva A., Evans T. i wsp. Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 1991; 354: 311–314.
70. Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 843–846.
71. Maru Y., Kobayashi T., Tanaka K., Shibuya M. BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 260: 309–312.
72. Lancaster C.A., Taylor-Harris P.M., Self A.J., Brill S., van Erp H.E., Hall A. Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 1137–1142.

73. Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401–410.
74. Wetzler M., Talpaz M., Yee G. i wsp. Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 3488–3492.
75. Laurent E., Talpaz M., Wetzler M., Kurzrock R. Cytoplasmic and nuclear localization of the 130 and 169 kDa Bcr proteins. *Leukemia* 2000; 14: 1892–1897.
76. Melo J.V., Gordon D.E., Cross N.C., Goldman J.M. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; 81: 158–165.
77. Pane F., Intrieri M., Quintarelli C., Izzo B., Muccioli G.C., Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene* 2002; 21: 8652–8667.
78. Melo J.V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375–2384.
79. Shepherd P., Suffolk R., Halsey J., Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br. J. Haematol.* 1995; 89: 546–554.
80. Vigneri P., Wang J.Y. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* 2001; 7: 228–234.
81. Gross A.W., Ren R. Bcr-Abl has a greater intrinsic capacity than v-Abl to induce the neoplastic expansion of myeloid cells. *Oncogene* 2000; 19: 6286–6296.
82. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990; 247: 1079–1082.
83. McWhirter J.R., Wang J.Y. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.* 1993; 12: 1533–1546.
84. Goga A., McLaughlin J., Afar D.E., Saffran D.C., Witte O.N. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 1995; 82: 981–988.
85. Ilaria R.L., Van Etten R.A. The SH2 domain of P210BCR/ABL is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood* 1995; 86: 3897–3904.
86. Million R.P., Van Etten R.A. The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 2000; 96: 664–670.
87. Arlinghaus R.B. The involvement of Bcr in leukemias with the Philadelphia chromosome. *Crit. Rev. Oncog.* 1998; 9: 1–18.
88. Arlinghaus R.B. Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein in leukemia. *Oncogene* 2002; 21: 8560–8567.
89. Perazzona B., Lin H., Sun T., Wang Y., Arlinghaus R. Kinase domain mutants of Bcr enhance Bcr-Abl oncogenic effects. *Oncogene* 2008; 27: 2208–2214.
90. Melo J.V., Deininger M.W. Biology of chronic myelogenous leukemia — signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2004; 18: 545–568.
91. Druker B.J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008; 112: 4808–4817.
92. Chang F., Steelman L.S., Lee J.T. i wsp. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 2003; 17: 1263–1293.
93. Chang F., Lee J.T., Navolanic P.M. i wsp. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 590–603.
94. Mandanas R.A., Leibowitz D.S., Gharehbaghi K. i wsp. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 1993; 82: 1838–1847.
95. Sawyers C.L., McLaughlin J., Witte O.N. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 307–313.
96. Pendergast A.M., Quilliam L.A., Cripe L.D. i wsp. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993; 75: 175–185.
97. Cortez D., Reuther G., Pendergast A.M. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 1997; 15: 2333–2342.
98. Pelicci G., Lanfrancone L., Salcini A.E. i wsp. Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene* 1995; 11: 899–907.
99. Oda T., Heaney C., Hagopian J.R., Okuda K., Griffin J.D., Druker B.J. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 22925–22928.
100. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 2000; 2: 289–305.
101. Jonuleit T., van der Kuip H., Miething C. i wsp. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 2000; 96: 1933–1939.
102. Gesbert F., Sellers W.R., Signoretti S. i wsp. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 39 223–39 230.
103. Di Paolo G., De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006; 443: 651–657.
104. Cantrell D.A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 1439–1445.
105. Skorski T., Bellacosa A., Nieborowska-Skorska M. i wsp. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997; 16: 6151–6161.
106. Sattler M., Mohi M.G., Pride Y.B. i wsp. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 2002; 1: 479–492.
107. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 2005; 5: 172–183.
108. Sattler M., Salgia R., Okuda K. i wsp. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 1996; 12: 839–846.
109. del Peso L., González-García M., Page C., Herrera R., Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687–689.
110. Steelman L.S., Pohnert S.C., Shelton J.G., Franklin R.A., Bertrand F.E., McCubrey J.A. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004; 18: 189–218.
111. Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R. i wsp. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318–1321.

112. Deming P.B., Schafer Z.T., Tashker J.S., Potts M.B., Deshmukh M., Kornbluth S. Bcr-Abl-mediated protection from apoptosis downstream of mitochondrial cytochrome C release. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 10 289–10 299.
113. Lee M.H., Lozano G. Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins. *Semin. Cancer Biol.* 2006; 16: 225–234.
114. Goetz A.W., van der Kuip H., Maya R., Oren M., Aulitzky W.E. Requirement for Mdm2 in the survival effects of Bcr-Abl and interleukin 3 in hematopoietic cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 7635–7641.
115. Kim J.H., Chu S.C., Gramlich J.L. i wsp. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 2005; 105: 1717–1723.
116. Ilaria R.L., Van Etten R.A. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 31704–31710.
117. Chai S.K., Nichols G.L., Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol.* 1997; 159: 4720–4728.
118. Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A., Sattler M., Griffin J.D. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000; 95: 2118–2125.
119. Danial N.N., Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000; 19: 2523–2531.
120. Nieborowska-Skorska M., Wasik M.A., Slupianek A. i wsp. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 1229–1242.
121. Horita M., Andreu E.J., Benito A. i wsp. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 977–984.
122. Verfaillie C.M., Hurley R., Lundell B.I., Zhao C., Bhatia R. Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol.* 1997; 97: 40–52.
123. Bhatia R., Verfaillie C.M. Inhibition of BCR-ABL expression with antisense oligodeoxynucleotides restores beta1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 1998; 91: 3414–3422.
124. Gotoh A., Miyazawa K., Ohyashiki K. i wsp. Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp. Hematol.* 1995; 23: 1153–1159.
125. Salgia R., Li J.L., Lo S.H. i wsp. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *Biol. Chem.* 1995; 270: 5039–5047.
126. Cheng K., Kurzrock R., Qiu X. i wsp. Reduced focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation in BCR-ABL-transfected cells. *Cancer* 2002; 95: 440–450.
127. Uemura N., Salgia R., Li J.L., Pisick E., Sattler M., Griffin J.D. The BCR/ABL oncogene alters interaction of the adapter proteins CRKL and CRK with cellular proteins. *Leukemia* 1997; 11: 376–385.
128. Slupianek A., Schmutte C., Tomblin G. i wsp. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol. Cell.* 2001; 8: 795–806.
129. Slupianek A., Hoser G., Majsterek I. i wsp. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: 4189–4201.
130. Bedi A., Barber J.P., Bedi G.C. i wsp. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995; 86: 1148–1158.
131. Frit P., Bergmann E., Egly J.M. Transcription factor IIIH: a key player in the cellular response to DNA damage. *Biochimie* 1999; 81: 27–38.
132. Lee T.I., Young R.A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Ann. Rev. Genet.* 2000; 34: 77–137.
133. Takeda N., Shibuya M., Maru Y. The BCR-ABL oncoprotein potentially interacts with the xeroderma pigmentosum group B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 203–207.
134. Jackson A.L., Loeb L.A. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 2001; 477: 7–21.
135. Sattler M., Verma S., Shrikhande G. i wsp. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 24273–24278.
136. Nowicki M.O., Falinski R., Koptyra M. i wsp. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 2004; 104: 3746–3753.
137. Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Master A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1: 493–502.
138. Novartis Pharmaceuticals Corporation. Prescribing Information 2008. Available from URL: http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/gleevec_tabs.pdf
139. Peng B., Lloyd P., Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44: 879–894.
140. Peng B., Hayes D., Racine-Poon A. i wsp. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 935–942.
141. Nagar B., Bornmann W.G., Pellicena P. i wsp. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 2002; 62: 4236–4243.
142. Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2640–2653.
143. Deininger M.W., Druker B.J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* 2003; 55: 401–423.
144. Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 2000; 289: 1938–1942.
145. Corbin A.S., Buchdunger E., Pascal F., Druker B.J. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32214–32219.
146. Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H. i wsp. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996; 56: 100–104.
147. Carroll M., Ohno-Jones S., Tamura S. i wsp. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997; 90: 4947–4952.

148. Buchdunger E., Catherine L., Cioffi L. i wsp. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 295: 139–145.
149. Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E. i wsp. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on growth of BCR-ABL positive cells. *Nat. Med.* 1996; 2: 561–566.
150. Beran M., Cao X., Estrov Z. i wsp. Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing M, 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 1661–1672.
151. Dan S., Naito M., Tsuruo T. Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 710–715.
152. Gambacorti-Passerini C., le Coutre P., Moogni L. i wsp. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis.* 1997; 23: 380–394.
153. le Coutre P., Mologni L., Cleris L. i wsp. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive cells with an ABL kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 163–168.
154. Druker B.J., Talpaz T., Resta D.J. i wsp. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 1031–1037.
155. Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H. i wsp. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 1038–1042.
156. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. i wsp. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 645–653.
157. Talpaz M., Silver R.T., Druker B.J. i wsp. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002; 99: 1928–1937.
158. Sawyers C.L., Hochhaus A., Feldman E. i wsp. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: result of a phase II study. *Blood* 2002; 99: 3530–3539.
159. Hochhaus A., Druker B., Sawyers C. i wsp. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon- α treatment. *Blood* 2008; 111: 1039–1043.
160. O'Brien S.G., Guilhot F., Larson R.A. i wsp. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 994–1004.
161. Deininger M., O'Brien S.G., Guilhot F. i wsp. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; 114 (supl.): (abstrakt 1126).
162. Hughes T.P., Kaeda J., Branford S. i wsp. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1423–1432.
163. Kantarjian H., Talpaz M., O'Brien S. i wsp. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 2873–2878.
164. Cortes J., O'Brien S., Kantarjian H. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood* 2004; 104: 2204–2205.
165. Merante S., Orlandi E., Bernasconi P., Caatoni S., Boni M., Lazzarino M. Outcome of four patients with chronic myeloid leukemia after imatinib mesylate discontinuation. *Haematologica* 2005; 90: 979–981.
166. Rousselot P., Huguet F., Rea D. i wsp. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 2007; 109: 58–60.
167. Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2007; 64: 4–9.
168. Mauro M.J., Druker B.J., Maziarz R. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk. Res.* 2004; 28S1: 71–73.
169. Hochhaus A., Hughes T. Clinical resistance to imatinib: mechanisms and implications. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2004; 18: 641–656.
170. Goldman J.M., Melo J.V. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia — how does it work? *Acta Haematol.* 2008; 119: 212–217.
171. Hochhaus A., Erben P., Ernst T., Mueller M.C. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin. Hematol.* 2007; 44: 15–24.
172. Roche-Lestienne C., Preudhomme C. Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Semin. Hematol.* 2003; 40: 80–82.
173. Willis S.G., Lange T., Demehri S. i wsp. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 2005; 106: 2128–2137.
174. Koptyra M., Falinski R., Nowicki M.O. i wsp. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 2006; 108: 319–327.
175. Sherbenou D.W., Wong M.J., Humayun A. i wsp. Mutations of the BCR-ABL-kinase domain occur in a minority of patients with stable complete cytogenetic response to imatinib. *Leukemia* 2007; 21: 489–493.
176. Melo J.V., Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.* 2007; 249: 121–132.
177. Apperley J.F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 1018–1029.
178. Azam M., Latek R.R., Daley G.Q. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112: 831–843.
179. Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K. i wsp. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876–880.
180. Cowan-Jacob S.W., Guez V., Fendrich G. i wsp. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev. Med. Chem.* 2004; 4: 285–299.
181. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. i wsp. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276–283.

182. von Bubnoff N., Schneller F., Peschel C., Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 2002; 359: 487–491.
183. La Rosée P., Corbin A.S., Stoffregen E.P., Deininger M.W., Druker B.J. Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res.* 2002; 62: 7149–7153.
184. Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B. i wsp. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117–125.
185. Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B. i wsp. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96: 1070–1079.
186. Weisberg E., Griffin J.D. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000; 95: 3498–3505.
187. le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M. i wsp. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000; 95: 1758–1766.
188. Tipping A.J., Mahon F.X., Lagarde V., Goldman J.M., Melo J.V. Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Blood* 2001; 98: 3864–3867.
189. Burchert A., Wang Y., Cai D. i wsp. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 2005; 19: 1774–1782.
190. Donato N.J., Wu J.Y., Stapley J. i wsp. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003; 101: 690–698.
191. Tipping A.J., Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate. *Exp. Hematol.* 2003; 31: 1073–1080.
192. Floyd M.D., Gervasini G., Masica A.L. i wsp. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 595–606.
193. Picard S., Titier K., Etienne G. i wsp. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 109: 3496–3499.
194. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 48–58.
195. Widmer N., Colombo S., Buclin T., Decosterd L.A. Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood* 2003; 102: 1142.
196. Illmer T., Schaich M., Platzbecker U. i wsp. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* 2004; 18: 401–408.
197. Thomas J., Wang L., Clark R.E., Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 2004; 104: 3739–3745.
198. Mahon F.X., Belloc F., Lagarde V. i wsp. MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 2003; 101: 2368–2373.
199. Burger H., van Tol H., Boersma A.W. i wsp. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 2004; 104: 2940–2942.
200. Burger H., van Tol H., Brok M. i wsp. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4: 747–752.
201. White D.L., Saunders V.A., Dang P. i wsp. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 2006; 108: 697–704.
202. Crossman L.C., Druker B.J., Deininger M.W., Pirmohamed M., Wang L., Clark R.E. hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* 2005; 106: 1133–1134.
203. Cohen M.H., Williams G., Johnson J.R. i wsp. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 935–942.
204. Gambacorti-Passerini C., Zucchetti M., Russo D. i wsp. Alpha1-acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 625–632.
205. Gambacorti-Passerini C., Barni R., le Coutre P. i wsp. Role of alpha1-acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92: 1641–1650.
206. Jørgensen H.G., Elliott M.A., Allan E.K., Carr C.E., Holyoake T.L., Smith K.D. Alpha1-acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood* 2002; 99: 713–715.
207. Jørgensen H.G., Holyoake T.L. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35: 1347–1351.
208. Jiang X., Zhao Y., Smith C. i wsp. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 2007; 21: 926–935.
209. La Rosée P., Shen L., Stoffregen E.P., Deininger M., Druker B.J. No correlation between the proliferative status of Bcr-Abl positive cell lines and the proapoptotic activity of imatinib mesylate (Gleevec/Glivec). *Hematol. J.* 2003; 4: 413–419.
210. Jørgensen H.G., Copland M., Allan E.K. i wsp. Intermittent exposure of primitive quiescent chronic myeloid leukemia cells to granulocyte-colony stimulating factor in vitro promotes their elimination by imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 626–633.
211. Holtz M., Forman S.J., Bhatia R. Growth factor stimulation reduces residual quiescent chronic myelogenous leukemia progenitors remaining after imatinib treatment. *Cancer Res.* 2007; 67: 1113–1120.
212. Sorel N., Bonnet M.L., Guillier M., Guilhot F., Brizard A., Turhan A.G. Evidence of ABL-kinase domain mutations in highly purified primitive stem cell populations of patients with chronic myelogenous leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 323: 728–370.
213. Baccarani M., Cortes J., Pane F. i wsp. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 6041–6051.
214. Apperley J.F. Part II: management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 1116–1128.
215. Kantarjian H.M., Talpaz M., O'Brien S. i wsp. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2003; 101: 473–475.

216. Marin D., Goldman J.M., Olavarria E., Apperley J.F. Transient benefit only from increasing the imatinib dose in CML patients who do not achieve complete cytogenetic remissions on conventional doses. *Blood* 2003; 102: 2702–2703.
217. Lombardo L.J., Lee F.Y., Chen P. i wsp. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide(BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 6658–6661.
218. Tokarski J.S., Newitt J.A., Chang C.Y. i wsp. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006; 66: 5790–5797.
219. O'Hare T., Walters D.K., Stoffregen E.P. i wsp. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005; 65: 4500–4505.
220. Nam S., Williams A., Vultur A. i wsp. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* 2007; 6: 1400–1405.
221. Copland M., Hamilton A., Elrick L.J. i wsp. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 2006; 107: 4532–4539.
222. Golemovic M., Verstovsek S., Giles F. i wsp. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 4941–4947.
223. Jørgensen H.G., Allan E.K., Jordanides N.E., Mountford J.C., Holyoake T.L. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 2007; 109: 4016–4019.
224. Weisberg E., Manley P.W., Breitenstein W. i wsp. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 2005; 7: 129–141.
225. Puttini M., Coluccia A.M., Boschelli F. i wsp. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 11314–11322.
226. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. i wsp. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 469–471.
227. Kimura S., Naito H., Segawa H. i wsp. NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood* 2005; 106: 3948–3954.
228. Niwa T., Asaki T., Kiura S. NS-187 (INNO-406), a Bcr-Abl/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor. *Anal. Chem. Insights* 2007; 2: 93–106.
229. Gumireddy K., Baker S.J., Cosenza S.C. i wsp. A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 1992–1997.
230. Harrington E.A., Bebbington D., Moore J. i wsp. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat. Med.* 2004; 10: 262–267.
231. Carter T.A., Wodicka L.M., Shah N.P. i wsp. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 11011–11016.
232. Giles F.J., Cortes J., Jones D., Bergstrom D., Kantarjian H., Freedman S.J. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 2007; 109: 500–502.
233. Young M.A., Shah N.P., Chao L.H. i wsp. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res.* 2006; 66: 1007–1014.